(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) **1-0048308**

(51)[2020.01] **C07K 16/28**; C07K 14/725; C07K 16/46; C07K 16/30; A61K 39/00

(13) **B**

(21) 1-2022-01288
(22) 31/07/2020
(86) PCT/EP2020/071660 31/07/2020
(87) WO2021023658 11/02/2021
(30) 10 2019 121 007.0 02/08/2019 DE; 62/882,131 02/08/2019 US; 62/905,782 25/09/2019 US
(45) 25/07/2025 448
(43) 25/05/2022 410A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany
(72) HUTT, Meike (DE); UNVERDORBEN, Felix (DE); BUNK, Sebastian (DE); MAURER, Dominik (DE); HOFMANN, Martin (DE); PSZOLLA, Gabriele (DE); YOUSEF, Sara (DE); WAGNER, Claudia (DE); SCHWÖBEL, Frank (DE); SCHUSTER, Heiko (DE).
(74) Công ty TNHH dịch vụ sở hữu trí tuệ DREWMARKS (DREWMARKS CO .,LTD.)

(54) PROTEIN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM PROTEIN NÀY

(21) 1-2022-01288

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên và dược phẩm bao gồm protein này. Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên liên kết cụ thể với các kháng nguyên được dẫn xuất từ protein kháng nguyên liên quan đến melanoma A (melanoma associated antigen A - MAGE-A). Cụ thể, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên mà liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein tương hợp mô chính (major histocompatibility complex - MHC). Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế chứa, cụ thể là, các vùng xác định bổ sung (complementary determining region - CDR) của các thụ thể tế bào T (T cell receptor - TCR) được tạo mới mà liên kết cụ thể với peptit MAGE-A/MHC nói trên. Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có công dụng cho việc chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa các bệnh ung thư thể hiện MAGE-A. Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, các vectơ bao gồm các axit nucleic này, các tế bào tái tổ hợp thể hiện các protein liên kết kháng nguyên và các dược phẩm bao gồm các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên liên kết cụ thể với các kháng nguyên được dẫn xuất từ protein kháng nguyên liên quan đến melanoma A (melanoma associated antigen A - MAGE-A). Cụ thể, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên mà liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein tương hợp mô chính (major histocompatibility complex - MHC). Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế chứa, cụ thể là, các vùng xác định bổ sung (complementary determining region - CDR) của các thụ thể tế bào T (T cell receptor - TCR) được tạo mới mà liên kết cụ thể với peptit MAGE-A/MHC nói trên. Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có công dụng cho việc chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa các bệnh ung thư biểu hiện MAGE-A. Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, các vectơ bao gồm các axit nucleic này, các tế bào tái tổ hợp biểu hiện các protein liên kết kháng nguyên và các dược phẩm bao gồm các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên khối u MAGE-A của trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' (SEQ ID NO: 1), cũng được biết đến như là peptit MAG-003, là yếu tố quyết định kháng nguyên tế bào lympho T độc tế bào (cytotoxic T lymphocyte - CTL) giới hạn bởi HLA-A*02:01 của MAGE-A4 (các axit amin 286-294) và MAGE-A8 (các axit amin 288-296) (Jia ZC et al. Clin Dev. Immunol. 2010, 567594). MAGE-A4 và MAGE-A8 đều là các protein và các thành viên của họ gen MAGE-A. Các chức năng của MAGE-A8 và MAGE-A4 không được biết đến, mặc dù chúng có thể đóng vai trò trong sự phát triển phôi thai và sự biến đổi khối u hoặc các khía cạnh của sự tiến triển khối u. Nhiều biến thể được ghép nối theo cách khác đã được phát hiện cho các protein này. Kháng nguyên MAGE-A của SEQ ID NO: 1 thuộc về các kháng nguyên ung thư/tinh hoàn (cancer/testis - CT) mà được biểu hiện trong các khối u nhưng không trong các mô bình thường ngoại trừ tinh hoàn và nhau thai, sự biểu hiện của protein MAGE-A4

và mRNA, ví dụ, đã được liên kết với sự phát triển và tiên lượng cho nhiều loại ung thư. Các peptit, ví dụ như MAGE-A, cụ thể là MAGE-A4 và/hoặc MAGE-A8, peptit được dẫn xuất 'KVLEHVVRV', mà được thể hiện bởi các phân tử của MHC có thể được liên kết bởi các TCR và do đó là mục tiêu của, ví dụ, miễn dịch trị liệu dựa trên tế bào T. Các kháng nguyên MAGE-A và các peptit yếu tố quyết định kháng nguyên của chúng do đó đã được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch trị liệu khối u.

Trong khi đã đạt được các cải thiện trong sự phát triển các loại thuốc nhắm đến phân tử cho trị liệu ung thư, vẫn còn cần có giải pháp phát triển các chất chống lại ung thư mới mà nhắm đến cụ thể các phân tử đặc hiệu cao với các tế bào ung thư nhưng không phải là với các tế bào bình thường.

Do đó, sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên mới đặc hiệu cho kháng nguyên được biểu hiện khối u MAGE-A của SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein MHC.

WO 2017/158103 bộc lộ các TCR, cụ thể hơn là các TCR nguyên bản, ví dụ, TCR nguyên bản R7P1D5, mà liên kết với phức hợp của peptit kháng nguyên MAGE-A có trình tự axit amin của KVLEHVVRV có SEQ ID NO: 1 và phân tử lớp I HLA, và công dụng của chúng trong chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa các bệnh ung thư. Tuy nhiên, các TCR nguyên bản liên kết cụ thể với các kháng nguyên ung thư được thể hiện bởi MHC thường có độ bám dính thấp hơn (K_D = 1-300 μM) khi so sánh với các TCR liên kết cụ thể với các kháng nguyên virut được thể hiện bởi MHC. Phần của sự giải thích cho hiện tượng này có thể là, các tế bào T mà phát triển trong tuyến ức được lựa chọn âm tính (sự cảm ứng độ dung nạp) trên các phối từ MHC peptit tự thân, sao cho các tế bào T với độ bám dính quá cao với các MHC peptit tự thân được xóa bỏ. Độ bám dính thấp này có thể là một trong những sự giải thích khả thi cho sự thoát miễn dịch khối u (Aleksic et al.,c2012, Eur J Immunol. 2012 Dec;42(12):3174-9). Do đó, có lẽ mong muốn là thiết kế các biến thể TCR mà liên kết với độ bám dính cao hơn với các kháng nguyên ung thư cho công dụng như là kháng nguyên nhận biết các cấu trúc trong trị liệu tế bào nuôi (adoptive cell therapy - ACT), hoặc như là môđun nhận biết của cách tiếp cận hòa tan, nghĩa là, sử dụng các phân tử nhị đặc hiệu (Hickman et al., 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep;21(8):769-85).

Tuy nhiên, sự tăng độ bám dính của các TCR cũng có thể làm tăng rủi ro các tác dụng phụ. Như được đề cập ở trên, trong tự nhiên các TCR có độ bám dính cao được hướng đến để chống lại các kháng nguyên liên quan đến khối u, mà là các protein tự thân, được loại trừ bởi sự lựa chọn tuyến ức, để tránh sự nhận biết các peptit tự thân xuất hiện trên mô bình thường thông qua phản ứng chéo. Theo đó, chỉ đơn giản làm tăng độ bám dính TCR cho trình tự đích của nó có khả năng cũng làm tăng độ bám dính với các peptit không cụ thể cho ung thư tương tự và do đó làm tăng rủi ro phản ứng chéo và các tác dụng độc hại không mong muốn trên mô khỏe mạnh. Việc đây không chỉ là rủi ro về lý thuyết đã được khám phá cho MAGE-A3 nhắm đến các TCR được thiết kế. Cụ thể, các kết quả được công bố trước đây đã cho thấy độc tính gây chết người trong hai bệnh nhân, người được dung nạp các tế bào T được thiết kế để biểu hiện MAGE-3 nhắm đến TCR phản ứng chéo với peptit từ protein cơ bắp Titin, mặc dù không có phản ứng chéo nào được dự đoán trong các nghiên cứu trước lâm sàng (Linette GP et al., Blood 2013;122:863–71, Cameron BJ, et al. Sci. Transl. Med. 2013; 5: 197-103). Các bệnh nhân này chứng minh rằng các tế bào T được thiết kế TCR có thể có các độc tính cụ thể cho cơ quan và ngoài mục tiêu nghiêm trọng và không dự đoán được.

Theo đó, có nhu cầu trong y học chưa được đáp ứng trong việc phát triển và đề xuất các protein liên kết kháng nguyên hoặc các TCR liên kết cụ thể với mục tiêu của chúng với độ bám dính cao hơn, do đó cho phép nhắm đến thậm chí là tế bào khối u hoặc các dòng tế bào với sự biểu hiện giảm của peptit kháng nguyên đích, trong khi duy trì được độ an toàn cao do phản ứng phụ thấp hoặc được làm giảm với các peptit ngoài mục tiêu (cũng được đề cập đến như là "các peptit tương tự"). Nói cách khác, các tác giả sáng chế đã có thể phát triển các protein liên kết kháng nguyên mà thể hiện độ bám dính liên kết cao với peptit đích của chúng trong khi duy trì được sự chọn lọc khối u cao.

Ngoài ra, như các tác giả sáng chế cho thấy, phân tử TCR đặc hiệu MAGE-A R7P1D5 cho thấy độ hòa tan tương đối thấp như là kết cấu chuỗi đơn lẻ hoặc dưới dạng nhị đặc hiệu được đề cập đến như là TCER (trong các phân tử "TCER™" hoặc "TCER" sau đây), mà bao gồm phần liên kết cụ thể với phân tử bề mặt trên tế bào T và liên kết cụ thể với phức hợp peptit MHC.

Do đó, mặc dù đã có các cải thiện trong công nghệ TCR, vẫn cần có các phép trị liệu ung thư khác, cụ thể là các phép trị liệu có thể nhắm đến và tiêu diệt một cách hiệu quả các tế bào ung thư. Cụ thể, cần phát triển các protein liên kết kháng nguyên mới mà, i) chọn lọc và cụ thể cho peptit MAGE-A đặc hiệu cho khối u của SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein MHC có hoạt tính sinh học mong muốn, ii) có tiểu sử tốt về trao đổi vật chất, tác dụng hóa học, độ hòa tan và/hoặc độ an toàn, và iii) có thể được sản xuất với quy mô lớn.

Theo đó, trong ngữ cảnh của sáng chế, các tác giả sáng chế đã thiết kế một số protein liên kết kháng nguyên bao gồm các biến thể CDR được dẫn xuất từ TCR R7P1D5 mẹ nói trên. Các protein liên kết kháng nguyên này có độ bám dính liên kết được tăng cường cho phức hợp peptit-MHC và độ ổn định được tăng cường, và/hoặc độ hòa tan được tăng cường, khiến chúng phù hợp hơn cho công dụng y khoa.

Ngoài ra, như được chứng minh bởi các tác giả sáng chế, các protein liên kết kháng nguyên mới này liên kết và nhắm đến các tế bào ung thư một cách hiệu quả mà thậm chí có các số lượng bản sao thấp và, một cách có lợi, duy trì tiểu sử độ an toàn cao với phản ứng chéo thấp với các peptit tương tự.

Ngoài ra, các protein liên kết kháng nguyên này, cụ thể là dưới dạng các phân tử TCER™, cho thấy độc tế bào cao chống lại các tế bào khối u. Ví dụ, đối với các protein liên kết kháng nguyên mới dưới dạng các phân tử TCER™, nồng độ hiệu quả nửa cực đại (EC_{50}) chống lại các tế bào NCI-H1755, Hs695T và U2OS nằm trong khoảng từ 1 đến 300 pM, từ 1 pM đến 100 pM, cụ thể hơn là, giữa 1 pM và 20 pM đối với các tế bào. Ngoài ra, EC_{50} của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là cao hơn 100 lần, tốt hơn là hơn 100 lần, xét đến các dòng tế bào của mô khỏe mạnh như là các dòng tế bào sơ cấp so với dòng tế bào khối u Hs695T, biểu thị độ an toàn cao của nó.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã thể hiện đối với các protein liên kết kháng nguyên mới này, cụ thể là các phân tử TCER, *in vivo*, sự ngăn cản sự phát triển khối u đáng kể trong mô hình chuột trị liệu thậm chí ở các liều thấp.

Do đó, sáng chế đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên cụ thể với peptit kháng nguyên được dẫn xuất từ MAGE-A trong phức hợp với protein MHC, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có độ ổn định được nâng cao, ví dụ như độ kết tụ

giảm, trong khi ép và/hoặc lọc, ví dụ, so với TCR R7P1D5 nguyên bản. Ngoài ra, các protein liên kết kháng nguyên đã nói có độc tế bào cao, ví dụ, chống lại các dòng tế bào NCI-H175, các tế bào Hs695T và các tế bào U2OS.

Tóm lại, các phát hiện đáng kể của các tác giả sáng chế đề xuất, không kể những điều khác, các hiệu quả có lợi sau đây so với giải pháp theo tình trạng kỹ thuật: (i) sự giảm của phản ứng chéo của các TCR hoặc các protein liên kết kháng nguyên với các peptit tương tự trên các mô khỏe mạnh và duy trì độ chọn lọc khối u cao; (ii) tiểu sử độ an toàn được gia tăng của các TCR hoặc các protein liên kết kháng nguyên; (iii) các TCR hoặc các protein liên kết kháng nguyên làm giảm độc tế bào ngoài mục tiêu và ngoài khối u; và (iv) sự cung cấp các TCR và các protein liên kết kháng nguyên cụ thể, chọn lọc và an toàn được cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ "protein liên kết kháng nguyên" ở đây đề cập đến các polypeptit hoặc các protein liên kết mà có thể liên kết với ít nhất một kháng nguyên, cụ thể, kháng nguyên như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế. Theo phương án được ưu tiên, các protein liên kết kháng nguyên này có khả năng liên kết đồng thời với hai kháng nguyên khác nhau, như được biết đến từ, ví dụ, các kháng thể nhị đặc hiệu. Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm ít nhất 6 CDR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, mà ban đầu được dẫn xuất từ TCR. Theo phương án cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm ít nhất một miền alpha biến đổi và ít nhất một miền beta biến đổi như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, mà ban đầu được dẫn xuất từ TCR.

"Miền" là vùng của protein được xác định trên cơ sở các đồng đẳng trình tự và thường liên quan đến thực thể cấu trúc hoặc thực thể chức năng cụ thể. Các ví dụ cho các miền này là miền chuỗi nhẹ biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể, miền chuỗi nặng biến đổi của chuỗi nặng kháng thể, miền C_{H1}, C_{H2} và C_{H3} (các miền hằng định) của chuỗi nặng kháng thể, miền biến đổi của chuỗi α của TCR hoặc miền biến đổi của chuỗi β của TCR.

Thuật ngữ "kháng nguyên" hoặc "kháng nguyên đích" được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử hoặc phần của phân tử hoặc phức hợp mà có khả năng được liên kết bởi ít

nhất một vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó một vị trí liên kết kháng nguyên nói trên, ví dụ, có mặt trong kháng thể thông thường, TCR thông thường và/hoặc trong các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Kháng nguyên mà cụ thể được liên kết bởi các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1, cụ thể hơn là, peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1, trong phức hợp với protein MHC.

Thuật ngữ "yếu tố quyết định kháng nguyên" được sử dụng ở đây bao gồm các thuật ngữ "yếu tố quyết định kháng nguyên về cấu trúc" và "yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng". "Yếu tố quyết định kháng nguyên về cấu trúc" là các axit amin của kháng nguyên, ví dụ, phức hợp peptit-MHC, mà được bao phủ bởi protein liên kết kháng nguyên khi được liên kết với kháng nguyên. Cụ thể, tất cả các axit amin của kháng nguyên được coi là được bao phủ mà nằm trong khoảng 5 Å của bất kỳ nguyên tử nào của axit amin của protein liên kết kháng nguyên. Yếu tố quyết định kháng nguyên về cấu trúc của kháng nguyên có thể được xác định bởi các phương pháp đã biết bao gồm phép tinh thể lọc tia X hoặc phép phân tích NRM. Yếu tố quyết định kháng nguyên về cấu trúc của kháng thể thường bao gồm từ 20 đến 30 axit amin. Yếu tố quyết định kháng nguyên về cấu trúc của TCR thường bao gồm từ 20 đến 30 axit amin. "Yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng" là tập con gồm các axit amin tạo thành yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng và bao gồm các axit amin của kháng nguyên mà là quan trọng cho sự tạo thành giao diện với protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, bằng cách trực tiếp tạo thành các tương tác không cộng hóa trị như các liên kết H, các cầu nối muối, sự xếp chồng thơm hoặc các tương tác kỵ nước hoặc bằng cách gián tiếp ổn định hình thể liên kết của kháng nguyên và, ví dụ, được xác định bằng cách quét đột biến. Thông thường, yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng của kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể bao gồm từ 4 đến 6 axit amin. Thông thường, yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng của phức hợp peptit-MHC bao gồm từ 2 đến 6 axit amin của peptit và 2 đến 7 axit amin của phân tử MHC. Vì các peptit được thể hiện MHC I thường có độ dài từ 8 đến 10 axit amin, chỉ tập con các axit amin của mỗi peptit nhất định là phần của yếu tố quyết định kháng

nguyên về chức năng của phức hợp peptit-MHC. Trong ngữ cảnh của sáng chế, yếu tố quyết định kháng nguyên, đặc biệt là yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng được liên kết với các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa các axit amin của kháng nguyên cần thiết để tạo thành giao diện liên kết, do đó, yếu tố quyết định kháng nguyên về chức năng bao gồm ít nhất 3, tốt hơn là ít nhất 4 axit amin của peptit kháng nguyên MAGE-A của SEQ ID NO: 1.

Các protein họ con "MAGE-A" hay "kháng nguyên liên quan đến melanoma A" là các kháng nguyên liên quan đến khối u đầu tiên được phát hiện ra ở cấp độ phân tử (van der Bruggen P, et al., Science. 1991; 254:1643–47). MAGE-A là họ con gồm 12 gen (từ MAGE-A1 đến MAGE-A12) nằm ở vùng q28 của nhiễm sắc thể X. Các thành viên thuộc các protein họ con MAGE-A bình thường được biểu hiện chỉ trong tinh hoàn hoặc bào thai và sự biểu hiện hạn chế của chúng gợi ý rằng chúng có thể có chức năng trong sự phát triển tế bào gốc. Các protein MAGE-A cũng được phát hiện trong quá trình phát triển ban đầu của hệ thần kinh trung ương, tủy sống và thân não, cho thấy rằng các protein MAGE-A cũng có thể tham gia vào quá trình phát triển tế bào thần kinh. Các thành viên của họ này mã hóa các protein có từ 50 đến 80% trình tự tương tự với nhau và tất cả các protein MAGE đều chia sẻ miền tương đồng MAGE chung (MAGE homology domain - MHD), miền được bảo toàn cao bao gồm khoảng 170 axit amin. Các chức năng sinh học và cơ chế điều chỉnh cơ bản của sự biểu hiện protein MAGE-A trong bệnh ung thư vẫn chưa được hiểu đầy đủ.

Protein “MAGE-A4” hoặc “kháng nguyên liên quan đến melanoma 4” là thành viên của họ gen MAGE-A và có số gia nhập Uniprot P43358 của SEQ ID NO: 97 (như có sẵn vào này 8 tháng 7 năm 2019). Khu trú MAGE-A4 đã được mô tả là tế bào chất. Tuy nhiên, sự nhuộm MAGE-A4 cũng đã được phát hiện trong các nhân, với sự phân bố khác biệt giữa nhân và tế bào chất ở các bệnh ung thư biệt hóa nhiều và ít biệt hóa hơn (Sarcevic B et al., 2003, Oncology 64, 443-449). MAGE-A4 được sử dụng làm chất đánh dấu tế bào gốc đực. Nó không được biểu hiện trong các tế bào sinh dục, nhưng được biểu hiện trong các tế bào tiền nguyên bào tinh và tế bào gốc trưởng thành (Mitchell et al., 2014, Mod. Pathol. 27, 1255-1266). Sự biểu hiện của protein MAGE-A4 và mRNA đã được liên kết đến sự phát triển và tiên lượng của các bệnh ung thư khác nhau.

Protein "MAGE-A8" hoặc "kháng nguyên liên quan đến melanoma 8" là thành viên của siêu họ gen MAGE-A và có số gia nhập Uniprot P43358 của SEQ ID NO: 98 (như có sẵn vào này 8 tháng 7 năm 2019).

Các protein "MAGE-A4" và "MAGE-A8" có mức tương đồng trình tự là 72% như được xác định bởi sự sắp xếp trình tự protein sử dụng thuật toán BLASTP 2.9.0 (Stephen F. et al.et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Hơn nữa, "MAGE-A4" và "MAGE-A8" đều bao gồm peptit MAG-003, tức là, KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

"Phức hợp tương hợp mô chính" (major histocompatibility complex - MHC) là tập hợp các protein bề mặt tế bào cần thiết cho hệ thống miễn dịch thu được để nhận biết các phân tử lạ ở động vật có xương sống, từ đó xác định tính tương hợp mô. Chức năng chính của các phân tử MHC là liên kết với các kháng nguyên có nguồn gốc từ mầm bệnh và hiển thị chúng trên bề mặt tế bào để các tế bào T thích hợp nhận biết. MHC ở người còn được gọi là phức hợp HLA (human leukocyte antigen - kháng nguyên bạch cầu người) (thường chỉ là HLA). Họ gen MHC được chia thành ba nhóm phụ: lớp I, lớp II và lớp III. Các phức hợp peptit và MHC lớp I được nhận biết bởi các tế bào T dương tính với CD8 mang thụ thể tế bào T (T-cell receptor - TCR) thích hợp, trong khi các phức hợp của các phân tử peptit và MHC lớp II được nhận biết bởi các tế bào T-trợ giúp-dương tính với CD4 mang TCR thích hợp. Vì cả hai loại phản hồi, phụ thuộc vào CD8 và CD4, đóng góp chung và hiệp đồng vào tác dụng chống lại khối u, nên việc phát hiện và xác định đặc điểm của các kháng nguyên liên quan đến khối u và các thụ thể tế bào T tương ứng là rất quan trọng trong việc phát triển các liệu pháp miễn dịch ung thư như vắc-xin và liệu pháp tế bào. Gen HLA-A nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6 và mã hóa chuỗi α lớn hơn, thành phần của HLA-A. Sự biến dị của chuỗi α HLA-A là chìa khóa cho chức năng của HLA. Sự biến dị này thúc đẩy sự đa dạng di truyền trong dân số. Vì mỗi HLA có độ bám dính khác nhau đối với các peptit của một số cấu trúc nhất định, càng có nhiều loại HLA có nghĩa là càng có nhiều loại kháng nguyên được 'có mặt' trên bề mặt tế bào. Mỗi cá nhân có thể biểu hiện tối đa hai loại HLA-A, mỗi loại từ mỗi người trong cha mẹ của họ. Một số cá nhân sẽ thừa hưởng cùng một HLA-A từ cả cha và mẹ, làm giảm sự đa dạng HLA cá nhân của họ; tuy nhiên, phần lớn các cá nhân sẽ nhận được hai bản sao khác nhau của HLA-A.

Mô hình tương tự này áp dụng cho tất cả các nhóm HLA. Nói cách khác, mỗi người chỉ có thể biểu hiện một hoặc hai trong số 2432 alen HLA-A đã biết.

Protein MHC lớp I HLA theo sáng chế có thể là protein HLA-A, HLA-B hoặc HLA-C, tốt hơn là protein HLA-A, tốt hơn nữa là HLA-A*02.

"HLA-A*02" biểu thị alen HLA cụ thể, trong đó chữ A biểu thị gen và hậu tố "*02" biểu thị kiểu huyết thanh A2.

Trong phản ứng miễn dịch phụ thuộc MHC lớp I, peptit không chỉ phải có khả năng liên kết với một số phân tử MHC lớp I nhất định được biểu hiện bởi các tế bào khối u, sau đó chúng còn phải được nhận biết bởi các tế bào T mang thụ thể tế bào T cụ thể (TCR).

"TCR" là protein bề mặt tế bào dị phân tử thuộc siêu họ globulin miễn dịch, được liên kết với các protein không biến dị của phức hợp CD3 liên quan đến sự tải nạp tín hiệu trung gian. Các TCR tồn tại ở dạng αβ và γδ, chúng giống nhau về cấu trúc nhưng có các vị trí và có lẽ là chức năng giải phẫu khá khác biệt. Mỗi phần ngoại bào của dị phân tử gốc αβ TCR và γδ TCR chứa hai polypeptit, mỗi polypeptit có miền hằng định màng gần và miền biến đổi màng xa. Mỗi miền hằng định và miền biến đổi bao gồm liên kết disulfua nội chuỗi. Các miền biến đổi chứa các vòng có tính đa hình cao tương tự như các vùng xác định bổ sung (complementarity determining region - CDR) của các kháng thể. Việc sử dụng liệu pháp gen TCR khắc phục được một số trở ngại hiện tại. Điều này cho phép trang bị điển hình cho các tế bào T của chính đối tượng (bệnh nhân) với các đặc tính mong muốn và tạo ra đủ số lượng tế bào T trong khoảng thời gian ngắn, tránh tình trạng chúng cạn kiệt. Ví dụ, TCR sẽ được tải nạp vào các tế bào T mạnh (ví dụ, tế bào T bộ nhớ trung tâm hoặc tế bào T có đặc điểm tế bào gốc), có thể đảm bảo tính bền vững, bảo quản và chức năng tốt hơn khi chuyển giao. Các tế bào T được tạo ra TCR sẽ được truyền vào bệnh nhân ung thư đã trở thành bệnh bạch huyết bằng hóa trị liệu hoặc chiếu xạ, cho phép tạo ra hiệu quả nhưng ức chế sự ức chế miễn dịch.

Thuật ngữ "TCR" ở đây biểu thị các TCR và các đoạn của chúng, cũng như các TCR chuỗi đơn và các đoạn của chúng, trong các miền alpha và beta biến đổi cụ thể của các TCR miền đơn và các TCR hợp thể, được nhân hóa, nhị đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu.

"Các đoạn của TCR" bao gồm phần của TCR nguyên vẹn hoặc nguyên bản, cụ thể là vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của TCR nguyên vẹn hoặc TCR nguyên bản. Ví dụ về các đoạn TCR bao gồm các đoạn của chuỗi α, β, δ, γ, ví dụ như V_α- C_a hoặc V_β- C_β hoặc các phần của chúng, các đoạn này cũng có thể còn bao gồm vùng bản lề tương ứng hoặc các miền biến đổi đơn lẻ, ví dụ như V_α, V_β, V_δ, V_γ, các đoạn VαVβ chuỗi đơn hoặc các TCR nhị đặc hiệu và đa đặc hiệu được hình thành từ các đoạn TCR. Các đoạn của TCR thực hiện các chức năng giống như so với TCR có chiều dài đầy đủ xảy ra tự nhiên, tức là, các đoạn liên kết một cách chọn lọc và cụ thể với peptit đích của chúng.

"TCR chuỗi đơn (single chain TCR - scTCR)" ở đây biểu thị protein trong đó các miền biến đổi của TCR, ví dụ như V_α và V_β hoặc V_δ và V_γ nằm trên một polypeptit. Thông thường, các miền biến đổi được phân tách bằng chất kết nối, trong đó chất kết nối này thường bao gồm từ 5 đến 20, ví dụ như từ 5 đến 15 axit amin.

"Nguyên bản" như được sử dụng ví dụ trong từ ngữ "TCR nguyên bản" đề cập đến TCR kiểu hình chuẩn.

Trong cách tiếp cận ACT, tế bào T chuyển gen được tạo ra có thể biểu hiện TCR kiểu hình chuẩn có chuỗi alpha và beta kiểu hình chuẩn, và TCR chuyển gen với chuỗi alpha và beta đặc hiệu cho phức hợp kháng nguyên-MHC đích tương ứng. Cả chuỗi alpha và beta kiểu hình chuẩn cũng như chuỗi alpha và beta chuyển gen thường vẫn có khả năng bắt cặp chéo với nhau. Khả năng bắt cặp không mong muốn này được gọi là "bắt cặp sai TCR" và là vấn đề được công nhận trong trị liệu TCR (gen). Việc bắt cặp sai và bắt cặp không chính xác giữa chuỗi TCR chuyển gen α hoặc β và chuỗi TCR nội sinh β hoặc α, tương ứng, có thể dẫn đến giảm biểu hiện bề mặt của dị phân tử TCRαβ chuyển gen, do đó làm giảm tính ham muốn chức năng của các tế bào T được sửa đổi. Hơn nữa, các tế bào T biểu hiện các TCR bị bắt cặp sai và mở rộng trong điều kiện IL-2 cao đã được chứng minh là gây ra bệnh ghép chống chủ (graft–versus–host disease - GvHD) trong mô hình tiền lâm sàng.

Một số chiến lược để tối ưu hóa việc bắt cặp TCR chuyển gen α và β để tránh bắt cặp sai có thể bao gồm những điều sau: 1. Các TCR được tinh chế: Theo cách tiếp cận này, các chuỗi hằng định TCRα và β của người được thay thế bằng các miền chuột tương ứng. Mặc dù các miền TCR-C của người và chuột cho thấy mức độ tương đồng

cao, nhưng các sự khác biệt nhỏ ảnh hưởng đến sự ổn định của các tương tác TCR/CD3 và do đó là các mức độ biểu hiện bề mặt TCR. 2. TCR được sửa đổi cystein: Cách tiếp cận này đưa các axit amin cystein vào vị trí thuận lợi về cấu trúc, và do đó cho phép hình thành ít nhất một cầu nối disulfua bổ sung và thúc đẩy sự bắt cặp chính xác giữa hai chuỗi TCR. Các đột biến hướng vào vị trí của, ví dụ, T48C trong chuỗi hằng định TCR alpha và S57C trong chuỗi hằng định TCR beta dẫn TCR dị phân tử được liên kết bởi hai liên kết liên chuỗi (tức là, cầu nối disulfua được đưa vào cộng với cầu nối disulfua xuyên màng nội sinh (vị trí số 95 trong miền hằng định alpha và vị trí số 131 trong miền hằng định beta). 3. Hoán đổi miền: Các miền hằng định được hoán đổi giữa các chuỗi α và β của thụ thể tế bào T đặc hiệu cho khối u, tạo ra TCR hoán đổi miền (domain-swapped TCR - dsTCR). Khi được bắt cặp chính xác, các chuỗi dsTCR này giữ lại tất cả các miền cần thiết để bổ sung các protein CD3, để biểu hiện trên bề mặt tế bào T, và làm trung gian cho các phản ứng chức năng của tế bào T khi tham gia vào kháng nguyên đích. Ngược lại, các TCR được bắt cặp sai chứa một chuỗi dsTCR và một chuỗi TCR kiểu hình chuẩn thiếu các miền chính cần thiết cho việc bổ sung, xuất và phát tín hiệu CD3 và do đó không thể làm trung gian cho quá trình tự miễn dịch có hại. 4. Các dị phân tử TCR độc nhất: Trong cách tiếp cận này, các lực tĩnh và tĩnh điện được khai thác để tạo điều kiện bắt cặp chính xác giữa các gen chuyển đổi TCR alpha và beta, đồng thời ức chế sự bắt cặp giữa các chuỗi TCR alpha và beta ngoại sinh và nội sinh. Một ví dụ sử dụng các đột biến hướng vào vị trí để đưa S85R vào miền hằng định alpha và R88G trong miền hằng định beta, để thu được những thay đổi cần thiết về điện tích tĩnh điện, và do đó tạo ra kết cấu 'núm thành lỗ' tương hỗ, kết cấu này được cho là làm biến dạng tối thiểu các cấu trúc cấp hai và cấp ba. 5. Việc sử dụng chuỗi hợp thể TCR-CD3ζ có mỗi chuỗi TCR được hợp nhất với một phân tử CD3ζ. 6. Việc sử dụng các TCR chuỗi đơn trong đó chuỗi V alpha của TCR được xác định được hợp nhất với chuỗi beta bằng cách sử dụng chất kết nối peptit linh hoạt. 7. Việc sử dụng các trình tự shRNA hoặc các nuclease ngón tay kẽm để loại bỏ sự biểu hiện của TCR nội sinh. Cách tiếp cận khác, được gọi là “khóa dán”, có thể bắt cặp hai chuỗi TCR với nhau do các tương tác tĩnh điện thuận lợi ở trạng thái dị phân tử. Có nghĩa là, hai peptit chủ yếu mở ra ở dạng phân lập nhưng liên kết ưu tiên để tạo thành dị phân tử cuộn xoắn, song song ổn định khi được trộn lẫn. Phương

pháp này có thể được áp dụng để tạo ra TCR hòa tan, trong đó phức hợp dị phân tử được ưa chuộng bằng cách hợp nhất các peptit với các chuỗi alpha và beta bị cắt ngắn tương ứng.

Các TCR dị phân tử alpha-beta nguyên bản có chuỗi alpha và chuỗi beta. Mỗi chuỗi alpha bao gồm các vùng biến đổi, nối và hằng định, và chuỗi beta cũng thường chứa vùng phân tập ngắn giữa vùng biến đổi và vùng nối, nhưng vùng phân tập này thường được coi là phần của vùng nối. Các vùng hằng định, hoặc C, của chuỗi TCR alpha và beta lần lượt được gọi là TRAC và TRBC (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Phụ lục 1: Phụ lục 10). Mỗi vùng biến đổi, ở đây được gọi là miền biến đổi alpha và miền biến đổi beta, bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) được ghi trong trình tự khung, một vùng là vùng siêu biến có tên CDR3. Các CDR miền biến đổi alpha ở đây được gọi là CDRa1, CDRa2, CDRa3 và CDR miền biến đổi beta ở đây được gọi là CDRb1, CDRb2, CDRb3. Có một số loại vùng biến đổi chuỗi alpha (Valpha) và một số loại vùng biến đổi chuỗi beta (Vbeta) được phân biệt bởi khung của chúng, trình tự CDR1 và CDR2, và bởi trình tự CDR3 được xác định một phần. Các loại Valpha được đề cập đến trong danh pháp IMGT bằng một số TRAV duy nhất, các loại Vbeta được đề cập đến trong danh pháp IMGT bằng một số TRBV duy nhất (Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc and LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). Để biết thêm thông tin về kháng thể globulin miễn dịch và gen TCR, xem hệ thống thông tin ImMunoGeneTics® quốc tế, Lefranc M-P et al. (Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43 (Database issue):D413-22; and http://www.imgt.org/). Do đó, vị trí liên kết kháng nguyên TCR thông thường bao gồm, thường là, sáu CDR, bao gồm tập hợp CDR từ mỗi vùng trong số vùng biến đổi chuỗi alpha và beta, trong đó các trình tự CDR1 và CDR3 có liên quan đến sự nhận biết và liên kết của kháng nguyên peptit mà được liên kết với protein HLA và các trình tự CDR2 có liên quan đến việc nhận biết và liên kết với protein HLA.

Tương tự với kháng thể, "vùng khung TCR" (Framework Regions - FR) đề cập đến trình tự axit amin xen kẽ giữa các CDR, tức là, với những phần của các vùng biến đổi chuỗi TCR alpha và beta mà ở mức độ nào đó được bảo toàn giữa các TCR khác nhau trong một loài. Mỗi chuỗi alpha và beta của TCR có bốn FR, ở đây được chỉ định

lần lượt là FR1-a, FR2-a, FR3-a, FR4-a và FR1-b, FR2-b, FR3-b, FR4-b. Do đó, miền biến đổi chuỗi alpha có thể được chỉ định là (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a) và miền biến đổi chuỗi beta do đó có thể được chỉ định là (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b).

Trong ngữ cảnh của sáng chế, định nghĩa CDR/FR trong chuỗi α hoặc β hoặc chuỗi γ hoặc δ phải được xác định dựa trên định nghĩa IMGT (Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org). Theo đó, các vị trí axit amin CDR/FR khi liên quan đến TCR hoặc các miền dẫn xuất TCR được chỉ ra theo định nghĩa IMGT đã nêu. Tốt hơn là, vị trí IMGT của các vị trí axit amin CDR/FR của miền biến đổi thứ nhất được đưa ra tương tự với cách đánh số IMGT của TRAV5 và/hoặc vị trí IMGT của các vị trí axit amin CDR/FR của miền biến đổi thứ hai được đưa ra trong tương tự với cách đánh số IMGT của TRBV12-4. Đối với các TCR gamma/delta, thuật ngữ "miền biến đổi TCR gamma" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ sự kết hợp của vùng TCR gamma V (TRGV) không có vùng dẫn đầu (L) và vùng TCR gamma J (TRGJ); và thuật ngữ miền hằng định gamma TCR đề cập đến vùng TRGC ngoại bào hoặc trình tự TRGC bị cắt đầu cuối C. Tương tự như vậy, thuật ngữ "miền biến đổi delta TCR " đề cập đến sự kết hợp của vùng TCR delta V (TRDV) không có vùng chỉ huy (L) và vùng TCR delta D/J (TRDD/TRDJ) và thuật ngữ "miền hằng định TCR delta" đề cập đến vùng TRDC ngoại bào, hoặc trình tự TRDC bị cắt đầu cuối C.

Trong “kháng thể” còn được gọi là “globulin miễn dịch”, hai chuỗi nặng được nối với nhau bằng liên kết disulfua và mỗi chuỗi nặng được nối với chuỗi nhẹ bằng liên kết disulfua. Có hai loại chuỗi nhẹ, lamda (l) và kappa (k). Có năm lớp chuỗi nặng chính (hoặc các lớp kháng thể) xác định hoạt động chức năng của phân tử kháng thể: IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. Mỗi chuỗi chứa các miền trình tự riêng biệt. Chuỗi nhẹ bao gồm hai miền hoặc vùng, miền biến đổi (V_L) miền hằng định (C_L). Chuỗi nặng bao gồm bốn miền, miền biến đổi (V_H) và ba miền hằng định (C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}, được đề cập tổng hợp là C_H). Các vùng biến đổi của cả chuỗi nhẹ (V_L) và chuỗi nặng (V_H) xác định sự nhận diện liên kết và tính đặc hiệu với kháng nguyên. Các miền vùng hằng định của chuỗi nhẹ (C_L) và chuỗi nặng (C_H) mang lại các đặc tính sinh học quan trọng như liên kết chuỗi kháng thể, bài tiết, tính di động xuyên nhau thai, liên kết bổ sung và liên kết với các thụ thể F_c (F_c receptor - F_cR). Đoạn Fv là phần đầu cuối N của đoạn

Fab của globulin miễn dịch và bao gồm các phần biến đổi của một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng. Tính đặc hiệu của kháng thể nằm ở sự bổ sung cấu trúc giữa vị trí kết hợp kháng thể (từ đồng nghĩa với vị trí liên kết kháng thể) và yếu tố quyết định kháng nguyên. Các vị trí kết hợp kháng thể được tạo thành từ các phần còn lại chủ yếu từ các vùng xác định bổ sung hoặc siêu biến (các CDR). Đôi khi, các phần còn lại từ không siêu biến hoặc FR ảnh hưởng đến cấu trúc miền tổng thể và do đó là vị trí kết hợp. CDR đề cập đến các trình tự axit amin cùng xác định độ bám dính liên kết và tính đặc hiệu của vùng Fv tự nhiên của vị trí liên kết với globulin miễn dịch nguyên bản. Mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của một globulin miễn dịch có ba CDR, được chỉ định lần lượt là CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L và CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H. Do đó, vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể thông thường bao gồm sáu CDR, bao gồm tập hợp CDR từ mỗi vùng của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ V.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, kháng thể hoặc globulin miễn dịch là IgM, IgD, IgG, IgA hoặc IgE.

"Vùng khung kháng thể" (Framework Regions - FR) đề cập đến các trình tự axit amin xen kẽ giữa các CDR, tức là, với những phần của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ globulin miễn dịch mà được bảo toàn tương ứng trong số các globulin miễn dịch khác nhau trong một loài. Mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch có bốn FR, được chỉ định lần lượt là FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L và FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H. Do đó, miền biến đổi chuỗi nhẹ có thể được chỉ định là (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L) và miền biến đổi chuỗi nặng do đó có thể được chỉ định là (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H).

Trong ngữ cảnh của sáng chế, định nghĩa CDR/FR trong chuỗi nhẹ hoặc nặng globulin miễn dịch, ngoại trừ miền F_C, sẽ được xác định dựa trên định nghĩa IMGT (Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org). Theo đó, trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi biến đổi nhất định và các trình tự axit amin của FR1, FR2, FR3, FR4 và FR5 được chỉ ra theo định nghĩa IMGT đã nêu.

Như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực tương ứng sẽ hiểu được, các cấu trúc của các kháng thể, cụ thể là cấu trúc của các chuỗi kháng thể nặng và nhẹ biến

đổi, là tương tự như các cấu trúc của cấu trúc miền biến đổi TCR alpha và beta. Do đó, các CDR của TCR theo sáng chế có thể được ghép vào các kháng thể thông thường, kháng thể nhị đặc hiệu hoặc kháng thể đa đặc hiệu.

Biết trình tự axit amin của các CDR của kháng thể, TCR hoặc protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực tương ứng có thể dễ dàng xác định các vùng khung, ví dụ như các vùng khung TCR hoặc các vùng khung kháng thể. Tuy nhiên, trong các trường hợp khi các CDR không được biểu thị, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực tương ứng trước tiên có thể xác định các trình tự axit amin CDR dựa trên định nghĩa IMGT cho các TCR hoặc định nghĩa IMGT cho các kháng thể và sau đó xác định các trình tự axit amin của các vùng khung.

Như được sử dụng ở đây, "vùng khung của người" là vùng khung về cơ bản giống nhau (khoảng 85% trở lên, cụ thể là 90%, 95%, 97%, 99% hoặc 100%) với vùng khung của protein liên kết kháng nguyên xảy ra tự nhiên, ví dụ như kháng thể xảy ra tự nhiên của người hoặc TCR của người.

Thuật ngữ “kháng thể” biểu thị các kháng thể và các đoạn của chúng, cũng như các kháng thể chuỗi đơn và các đoạn của chúng, cụ thể là trong chuỗi nặng biến đổi của kháng thể miền đơn, và các kháng thể hợp thể, được nhân hóa, nhị đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu.

“Kháng thể thông thường” như được đề cập ở đây là kháng thể có các miền giống như kháng thể được phân lập từ tự nhiên và bao gồm các CDR và vùng khung có dẫn xuất từ kháng thể. Tương tự như vậy, “TCR thông thường” như ở đây được đề cập đến là TCR bao gồm các miền giống như TCR nguyên bản và các CDR dẫn xuất TCR và các vùng khung.

Thuật ngữ "kháng thể được nhân hóa" đề cập đến kháng thể có nguồn gốc hoàn toàn hoặc một phần không phải từ người và đã được sửa đổi để thay thế một số axit amin nhất định, cụ thể là trong các vùng khung của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, nhằm tránh hoặc giảm thiểu phản hồi miễn dịch ở người. Các vùng hằng định của kháng thể được nhân hóa chủ yếu là các vùng C_H và C_L của người.

Nhiều phương pháp nhân hóa trình tự kháng thể đã được biết đến trong lĩnh vực này; xem, ví dụ, bài đánh giá của Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-

1633. Một phương pháp thường được sử dụng là ghép CDR, hoặc định hình lại kháng thể, bao gồm việc ghép các trình tự CDR của kháng thể người cho, thường là kháng thể chuột, vào giàn khung của kháng thể người có tính đặc hiệu khác nhau. Vì việc ghép CDR có thể làm giảm tính đặc hiệu và độ bám dính liên kết, và do đó là hoạt tính sinh học, của kháng thể không phải của người được ghép CDR, các đột biến ngược có thể được đưa vào các vị trí được lựa chọn của kháng thể được ghép CDR để giữ lại tính đặc hiệu và độ bám dính liên kết của kháng thể mẹ. Việc phát hiện các vị trí có thể có đột biến ngược có thể được thực hiện sử dụng thông tin có sẵn trong tài liệu và trong cơ sở dữ liệu kháng thể. Kỹ thuật nhân hóa thay thế để ghép CDR và đột biến ngược là tái tạo bề mặt, trong đó các phần còn lại không bị phơi nhiễm trên bề mặt có nguồn gốc không phải của con người được giữ lại, trong khi các phần còn lại trên bề mặt được thay đổi thành các phần còn lại của người. Kỹ thuật thay thế khác được biết đến là "lựa chọn có hướng dẫn" (Jespers et al., (1994) Biotechnology 12, 899) và có thể được sử dụng để dẫn xuất từ, ví dụ, kháng thể chuột hoặc chuột, kháng thể hoàn toàn của người bảo toàn các yếu tố quyết định kháng nguyên và các đặc điểm liên kết của kháng thể mẹ. Phương pháp nhân hóa khác là điều được gọi là nhân hóa 4D. Giao thức nhân hóa 4D được mô tả trong đơn đăng ký cấp bằng sáng chế US20110027266 A1 (WO2009032661A1) và được minh họa trong phần sau, áp dụng nhân hóa 4D để nhân hóa các miền (V_L) và nặng (V_H) biến đổi kháng thể chuột.

Đối với các kháng thể hợp thể, sự nhân hóa thường bao gồm việc sửa đổi các vùng khung của các trình tự vùng biến đổi.

Các gốc axit amin mà là phần của CDR thường sẽ không bị thay đổi liên quan đến sự nhân hóa, mặc dù trong một số trường hợp nhất định, có thể mong muốn thay đổi các gốc axit amin CDR riêng lẻ, ví dụ, để loại bỏ vị trí glycosyl hóa, vị trí khử amit, vị trí đồng phân hóa, hoặc gốc cystein không mong muốn. Quá trình glycosyl hóa liên kết N xảy ra bằng cách gắn chuỗi oligosaccarit vào gốc asparagin trong trình tự tripeptit Asn-X-Ser hoặc Asn-X-Thr, trong đó X có thể là bất kỳ axit amin nào ngoại trừ Pro. Việc loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa có thể đạt được bằng cách biến đổi gốc Asn hoặc Ser/Thr thành gốc khác, cụ thể là bằng cách thay thế bảo toàn. Quá trình khử amit của các gốc asparagin và glutamin có thể xảy ra tùy thuộc vào các yếu tố như độ pH và độ phơi nhiễm bề mặt. Các gốc asparagin đặc biệt dễ bị khử amit, chủ yếu

khi xuất hiện trong trình tự Asn-Gly, và ở mức độ thấp hơn trong các trình tự dipeptit khác như Asn-Ala. Khi vị trí khử amit như vậy, cụ thể là Asn-Gly, có mặt trong trình tự CDR, do đó, có thể mong muốn loại bỏ vị trí này, thường bằng cách thay thế bảo toàn để loại bỏ một trong các gốc có liên quan. Việc thay thế trong trình tự CDR để loại bỏ một trong các gốc có liên quan cũng được đề cập đến theo sáng chế.

"Các đoạn kháng thể" bao gồm phần của kháng thể nguyên vẹn, cụ thể là vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn. Ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, các diabody, các kháng thể nhị đặc hiệu và đa đặc hiệu được hình thành từ các đoạn kháng thể. Đoạn của kháng thể cũng có thể là kháng thể miền đơn, ví dụ như kháng thể chuỗi nặng hoặc VHH.

Thuật ngữ "Fab" biểu thị đoạn kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 Dalton và hoạt tính liên kết kháng nguyên, trong đó khoảng một nửa phía đầu cuối N của chuỗi H và toàn bộ chuỗi L, trong số các đoạn thu được bằng cách xử lý IgG với a protease, ví dụ, papain, được ràng buộc với nhau thông qua liên kết disulfua.

Thuật ngữ "nhị đặc hiệu" liên quan đến các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên có ít nhất hai hóa trị và các đặc tính liên kết đối với hai kháng nguyên khác nhau và do đó, bao gồm hai vị trí liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ "hóa trị" đề cập đến số lượng các vị trí liên kết của một protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên hai hóa trị liên quan đến một protein liên kết kháng nguyên có hai vị trí liên kết. Cần lưu ý rằng, thuật ngữ hóa trị đề cập đến số lượng các vị trí liên kết, trong đó các vị trí liên kết đó có thể liên kết với các mục tiêu giống nhau hoặc khác nhau, nghĩa là, protein liên kết kháng nguyên hóa trị hai có thể là đơn đặc hiệu, tức là, liên kết với một mục tiêu, hoặc nhị đặc hiệu, tức là, liên kết hai mục tiêu khác nhau. Mục tiêu có thể là kháng nguyên, peptit đích, peptit ngoài mục tiêu, tức là, peptit tương tự, hoặc tương tự.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, tốt hơn là ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên được dẫn xuất từ TCR, cụ thể hơn, ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên bao gồm các CDR dẫn xuất TCR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "nhị đặc hiệu", tốt hơn là ít nhất một tính đặc hiệu của các vị trí liên kết kháng nguyên được dẫn xuất từ TCR, cụ thể hơn, ít nhất một vị

trí liên kết kháng nguyên bao gồm các CDR dẫn xuất từ TCR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế. Do đó, "nhị đặc hiệu" trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên kết hợp ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên bao gồm các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, tức là, các CDR được dẫn xuất từ TCR, và ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên khác, trong đó ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên khác đã nói, có thể được dẫn xuất từ kháng thể và do đó bao gồm các CDR của kháng thể, hoặc từ TCR khác và do đó bao gồm các CDR của TCR khác. Tuy nhiên, theo phương án được ưu tiên, vị trí liên kết kháng nguyên khác nói trên, được dẫn xuất từ kháng thể và do đó bao gồm các CDR của kháng thể.

Thuật ngữ "định dạng" ở đây dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên bao gồm số lượng và loại miền cụ thể có trong protein liên kết kháng nguyên nói trên và tổ chức không gian của nó.

Nhiều định dạng khác nhau, ví dụ như các định dạng nhị đặc hiệu, được mô tả trong tình trạng kỹ thuật, cụ thể, trong ngữ cảnh của các kháng thể, các định dạng này thường bao gồm các ví dụ không giới hạn, ví dụ như, các diabody, miền biến đổi kép chéo (Cross-Over-Dual-Variable-Domain - CODV) và/hoặc trong các protein miền biến đổi kép (Dual variable domain - DVD). Tổng quan về các kháng thể nhị đặc hiệu khác nhau này và cách tạo ra chúng được bộc lộ trong, ví dụ, Brinkmann U. và Kontermann E.E. MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182-212. Cụ thể, định dạng DVD, ví dụ, được bộc lộ trong các bài báo khoa học sau (Wu C et al., Nat Biotechnol 2007; 25:1290-7; PMID:17934452; Wu C. et al. MAbs 2009; 1:339-47; Lacy SE et al. MAbs 2015; 7:605-19; PMID:25764208; Craig RB et al. PLoS One 2012; 7:e46778; PMID:23056448; Piccione EC et al. MAbs 2015). CODV được, ví dụ, bộc lộ trong Onuoha SC et al., Arthritis Rheumatol. 2015 Oct; 67(10):2661-72 hay, ví dụ, trong WO2012/135345, WO2016/116626. Các diabody nhị đặc hiệu được, ví dụ, mô tả trong Holliger P et al., Protein Eng 1996; 9:299-305; PMID:8736497; Atwell JL et al. Mol Immunol 1996; 33:1301-12; PMID:9171890; Kontermann RE, Nat Biotechnol 1997; 15:629-31; PMID:9219263; Kontermann RE et al. Immunotechnology 1997; 3:137-44; PMID:9237098; Cochlovius B et al. Cancer Res 2000; 60:4336-41; PMID:10969772; and DeNardo DG et al. Cancer Biother Radiopharm 2001; 16:525-35; PMID:11789029.

"Các diabody" được sử dụng trong ngữ cảnh của kháng thể, thường dùng để chỉ các phân tử hóa trị hai bao gồm hai chuỗi, mỗi chuỗi bao gồm miền VH và VL, từ cùng một kháng thể hoặc từ các kháng thể khác nhau. Hai chuỗi thường có kết cấu VHA-VLB và VHB-VLA (A và B thể hiện hai đặc điểm khác nhau) hoặc VLA-VHB và VLB-VHA.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "các diabody (Db)" hoặc "định dạng diabody" ở đây đề cập đến các phân tử hóa trị được cấu tạo từ hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi bao gồm hai miền biến đổi được nối với nhau bằng chất kết nối (L_{Db1} và L_{Db2}), trong đó hai trong số miền thứ nhất và miền thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế (V_1 và V_2) và hai miền còn lại có thể là miền biến đổi dẫn xuất từ TCR hoặc kháng thể (V_A,V_B). Các miền V_1 và V_2 nằm trên hai polypeptit khác nhau và các miền V_A và V_B nằm trên hai polypeptit khác nhau và các miền nhị trùng hóa theo định hướng đầu-đuôi. Theo đó, định hướng có thể là V_1-L_{Db1}-V_A và V_B-L_{Db2}-V_2, V_2-L_{Db1}-V_A và V_B-L_{Db2}-V_1, V_1-L_{Db1}-V_B và V_A-L_{Db2}-V_2 or V_2-L_{Db1}-V_B và V_A-L_{Db2}-V_1. Để cho phép các miền nhị trùng hóa đầu đuôi, chất kết nối, tức là L_{Db1} và L_{Db1}, có thể giống nhau hoặc khác nhau và là các chất kết nối ngắn. Chất kết nối ngắn là chất kết nối thường nằm trong khoảng từ 2 đến 12, từ 3 đến 13, ví dụ như, dài 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 axit amin, ví dụ, 4, 5 (Brinkmann U. và Kontermann E.E. (MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182–212) hoặc dài 8 axit amin, ví dụ như, 'GGGS' có SEQ ID NO: 100, 'GGGGS' có SEQ ID NO: 101 hoặc 'GGGSGGGG' có SEQ ID NO: 96.

Định dạng "globulin miễn dịch miền biến đổi kép (dual-variable-domain globulin miễn dịch - DVD-Ig™)" lần đầu tiên được mô tả vào năm 2007 bởi Wu C. et al., (Nat Biotechnol. 2007 Nov; 25(11):1290-7). Theo định dạng này, các miền biến đổi liên kết đích của, điển hình là, kháng thể đơn dòng thứ hai (B) thường được dung hợp với kháng thể thông thường (A) (bao gồm các miền V_{LA} và V_{HA}), trong đó chuỗi nhẹ của kháng thể thông thường (A) do đó bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung (V_{LB})và chuỗi nặng của kháng thể thông thường (A) bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung (V_{HB}). DVD-Ig™ như được mô tả trong giải pháp kỹ thuật này, do đó thường bao gồm hai chuỗi polypeptit, một chuỗi nặng bao gồm V_{HB}-L-V_{HA}-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và một chuỗi nhẹ bao gồm V_{LB}-L-V_{LA}-C_L. Do đó, các cặp miền V_{LA}/V_{HA} và V_{LA}/ V_{LA} đang bắt cặp song song với nhau.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "định dạng Ig miền biến đổi kép" dùng để chỉ protein bao gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi bao gồm hai miền biến đổi được nối với nhau bằng chất kết nối (L_1, L_3), trong đó hai trong số các miền là miền thứ nhất và miền thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế (V_1 và V_2) và hai miền còn lại là các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được dẫn xuất kháng thể (V_{HA} và V_{HB}). Ở định dạng DVD-Ig theo sáng chế, các chuỗi polypeptit có, ví dụ, tổ chức V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và V_2-L_3-V_{LA}-L_4-C_L hoặc V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L. Các chất kết nối nối L_1 và L_3 tốt hơn là có chiều dài từ 5 đến 20 gốc axit amin, ví dụ như 5 đến 15 gốc axit amin, và/hoặc các chất kết nối nối L_2 và L_4 có thể có mặt hoặc không có mặt.

"Các protein giống Ig miền biến đổi kép chéo" như được mô tả trong giải pháp kỹ thuật trong ngữ cảnh kháng thể thể hiện định dạng trong đó hai miền V_H và hai miền V_L được liên kết theo cách cho phép bắt cặp chéo của các miền V_H-V_L biến đổi, được sắp xếp (từ đầu cuối N- đến C-) theo thứ tự V_{HA}-V_{HB} và V_{LB}-V_{LA}, hoặc theo thứ tự V_{HB}-V_{HA} và V_{LA}-V_{LB}.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "protein giống Ig miền biến đổi kép chéo" đề cập đến protein bao gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi bao gồm hai miền biến đổi được nối với nhau bằng chất kết nối (L_1, L_2, L_3 và L_4), trong đó hai trong số các miền là miền thứ nhất và miền thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế (V_1 và V_2) và hai miền còn lại là các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được dẫn xuất kháng thể (V_{HA}, V_{HB}). Ở định dạng CDVD-Ig theo sáng chế, các chuỗi polypeptit có, ví dụ, tổ chức V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và V_{LA}-L_3-V_2-L_4-C_L, V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và V_{LA}-L_3-V_1-L_4-C_L, V_{HA}-L_1-V_1-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và V_2-L_3-V_{LA}-L_{DVD3}-C_L hoặc V_{HA}-L_1-V_2-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} và V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L. Ở định dạng CDVD này, các chất kết nối (L_1 đến L_4) thường có độ dài khác nhau, bao gồm các chất kết nối và chất kết nối all-glycin như được mô tả ở đây bên dưới trong chất kết nối phần. Ví dụ, L_1 có độ dài nằm trong khoảng từ 3 đến 12 gốc axit amin, L_2 có độ dài nằm trong khoảng từ 3 đến 14 gốc axit amin, L_3 có độ dài nằm trong khoảng từ 1 đến 8 gốc axit amin, và L_4 có độ dài nằm trong khoảng từ 1 đến 3 gốc axit amin, hoặc L_1 có độ dài nằm trong khoảng từ 5 đến 10 gốc axit amin, L_2 có độ dài nằm trong khoảng từ 5 đến 8 gốc axit amin, L_3 có độ dài nằm trong khoảng từ 1 đến 5 gốc axit amin, và L_4 có độ dài nằm trong khoảng

từ 1 đến 2 gốc axit amin hoặc L_1 có độ dài là 7 gốc axit amin, L_2 có độ dài là 5 gốc axit amin, L_3 có độ dài là 1 gốc axit amin, và L_4 có độ dài là 2 gốc axit amin.

"Ít nhất một" ở đây đề cập đến một hoặc nhiều đối tượng cụ thể ví dụ như 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 hoặc nhiều hơn 6 đối tượng cụ thể. Ví dụ, ít nhất một vị trí liên kết ở đây đề cập đến 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 hoặc nhiều hơn 6 vị trí liên kết.

Trình tự "giống ít nhất 85% với trình tự tham chiếu" là trình tự có, trên toàn bộ chiều dài, 85% trở lên, cụ thể là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% hoặc 99% nhận biết trình tự với toàn bộ độ dài của trình tự tham chiếu.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "phần trăm tương đồng" được tính toán bằng cách sử dụng sự căn chỉnh theo cặp toàn cục (tức là, hai trình tự được so sánh trên toàn bộ chiều dài của chúng). Phương pháp so sánh nhận biết của hai hoặc nhiều trình tự được biết đến nhiều trong lĩnh vực này. Chương trình "kim", sử dụng thuật toán căn chỉnh toàn cục Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) để tìm sự căn chỉnh tối ưu (bao gồm cả các khoảng trống) của hai trình tự khi xem xét toàn bộ chiều dài của chúng, có thể, ví dụ, được sử dụng. Ví dụ, chương trình kim có sẵn trên trang web World Wide Web và được mô tả thêm trong ấn phẩm sau (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276—277). Phần trăm nhận biết giữa hai polypeptit, theo sáng chế, được tính toán bằng cách sử dụng chương trình EMBOSS: kim (toàn cục) với thông số "Khoảng trống mở" bằng 10,0, thông số "Mở rộng khoảng trống" bằng 0,5 và ma trận Blosum62.

Các protein bao gồm trình tự axit amin "giống ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%" với trình tự tham chiếu có thể bao gồm các đột biến axit amin như mất đoạn, thêm đoạn và/hoặc các thay thế so với trình tự tham chiếu. Trong trường hợp thay thế, protein bao gồm trình tự axit amin ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống với trình tự tham chiếu có thể tương ứng với trình tự tương đồng được dẫn xuất từ loài khác với trình tự tham chiếu.

"Thay thế axit amin" có thể là bảo toàn hoặc không bảo toàn. Tốt hơn là, các thay thế là các thay thế bảo toàn, trong đó một axit amin được thay thế cho axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự.

Theo một phương án, những thay thế bảo toàn có thể bao gồm những thay thế được mô tả bởi Dayhoff trong tài liệu "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research, các nội dung được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ. Ví dụ, trong một khía cạnh, các axit amin, thuộc một trong các nhóm sau, có thể được trao đổi với nhau, do đó, tạo thành trao đổi bảo toàn: Nhóm 1: alanin (A), prolin (P), glycin (G), asparagin (N), serin (S), threonin (T); Nhóm 2: cystein (C), serin (S), tyrosin (Y), threonin (T); Nhóm 3: valin (V), isoleucin (I), leucin (L), methionin (M), alanin (A), phenylalanin (F); Nhóm 4: lysin (K), arginin (R), histidin (H); Nhóm 5: phenylalanin (F), tyrosin (Y), tryptophan (W), histidin (H); và Nhóm 6: axit aspartic (D), axit glutamic (E). Trong một khía cạnh, sự thay thế axit amin bảo toàn có thể được chọn như sau T → A, G → A, A → I, T → V, A → M, T → I, A → V, T → G, và/hoặc T → S.

Theo phương án khác, thay thế axit amin bảo toàn có thể bao gồm thay thế một axit amin bằng một axit amin khác cùng lớp, ví dụ, (1) không phân cực: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) phân cực không tích điện: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) có tính axit: Asp, Glu; và (4) bazơ: Lys, Arg, His. Các thay thế axit amin bảo toàn khác cũng có thể được thực hiện như sau: (1) thơm: Phe, Tyr, His; (2) phần tử cho proton: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; và (3) phần tử nhận proton: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (see, ví dụ, bằng sáng chế Hoa Kỳ số 10.106.805, nội dung được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ).

Theo phương án khác, các thay thế bảo toàn có thể được thực hiện theo Bảng 1. Các phương pháp dự đoán khả năng chịu đựng với sự sự đổi protein có thể được tìm thấy trong, ví dụ, Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004), các nội dung được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ.

Bảng 1: Thay thế axit amin bảo toàn

Các thay thế axit amin bảo toàn	
Axit amin	Các thay thế (các thay thế khác không được biết đến trong tình trạng kỹ thuật)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His

Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

Theo phương án khác, những thay thế bảo toàn có thể là những thay thế được thể hiện trong bảng 2 dưới tiêu đề "các thay thế bảo toàn". Nếu những thay thế như vậy dẫn đến thay đổi hoạt động sinh học, thì những thay đổi đáng kể hơn, "những thay ví dụ" được đặt tên trong bảng 2, có thể được đưa ra và sàng lọc các sản phẩm nếu cần.

Bảng 2: Thay thế axit amin

Các thay thế axit amin		
Gốc ban đầu (axit amin xảy ra tự nhiên)	Các thay thế bảo toàn	Các thay thế ví dụ
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala

Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên có thể bao gồm protein liên kết kháng nguyên biến thể, trong đó protein liên kết kháng nguyên biến thể này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất (ví dụ như chuỗi α) và chuỗi polypeptit thứ hai (ví dụ như chuỗi β) bao gồm tối đa 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 hoặc nhiều hơn nữa thay thế axit amin, tốt hơn là trong các vùng CDR của miền biến đổi thứ nhất (ví dụ như miền Valpha) và miền biến đổi thứ hai (ví dụ như miền Vbeta) so với protein liên kết kháng nguyên mà từ đó biến thể được dẫn xuất. Về vấn đề này, có thể có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 hoặc nhiều hơn nữa thay thế axit amin trong mỗi vùng CDR của protein liên kết kháng nguyên hoặc trong tất cả các vùng CDR của vùng biến đổi thứ nhất và/hoặc thứ hai. Sự thay thế có thể nằm trong CDR ở miền biến đổi thứ nhất và/hoặc miền biến đổi thứ hai.

Theo một phương án, biến thể là biến thể chức năng.

Thuật ngữ "biến thể chức năng" như được sử dụng ở đây đề cập đến protein liên kết kháng nguyên có tương đồng trình tự cơ bản hoặc có đáng kể hoặc tương tự với protein liên kết kháng nguyên mẹ, ví dụ như các protein liên kết kháng nguyên có chứa

các thay thế axit amin bảo toàn, trong đó biến thể chức năng này vẫn giữ được hoạt tính sinh học của protein liên kết kháng nguyên mẹ. Theo khía cạnh, các biến thể chức năng bao gồm, ví dụ, các biến thể của các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây (các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây sau đó được gọi là protein liên kết kháng nguyên mẹ) mà giữ được khả năng nhận biết các tế bào đích ở mức độ tương tự, cùng mức độ, hoặc ở mức độ cao hơn, như các protein liên kết kháng nguyên mẹ. Ví dụ, liên quan đến protein liên kết kháng nguyên mẹ, biến thể chức năng có thể có trình tự axit amin có trình tự giống ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin với protein liên kết kháng nguyên mẹ.

Ví dụ, biến thể chức năng có thể bao gồm trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên mẹ với ít nhất một thay thế axit amin bảo toàn. Ngoài ra hoặc theo cách khác, biến thể chức năng có thể bao gồm trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên mẹ với ít nhất một thay thế axit amin không bảo toàn. Trong trường hợp này, tốt hơn là, thay thế axit amin không bảo toàn không cản trở hoặc ức chế hoạt tính sinh học của biến thể chức năng. Tốt hơn là, thay thế axit amin không bảo toàn tăng cường hoạt tính sinh học của biến thể chức năng, sao cho hoạt tính sinh học của biến thể chức năng được tăng lên so với protein liên kết kháng nguyên mẹ.

Các TCR, polypeptit và protein liên kết kháng nguyên được sửa đổi theo sáng chế (bao gồm các phần chức năng và các biến thể chức năng) có thể có độ dài bất kỳ, tức là, có thể bao gồm bất kỳ số lượng axit amin nào, với điều kiện là các TCR, polypeptit hoặc protein được sửa đổi (hoặc các phần chức năng hoặc các biến thể chức năng của chúng) giữ nguyên hoạt tính sinh học của chúng, ví dụ, khả năng liên kết cụ thể với kháng nguyên, phát hiện các tế bào bị bệnh trong vật chủ hoặc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở vật chủ, v.v.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế (bao gồm các phần chức năng và các biến thể chức năng) có thể bao gồm các axit amin tổng hợp thay cho một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên. Các axit amin tổng hợp như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực này, và có thể bao gồm, ví dụ, axit aminocyclohexan carboxylic, norleucine, axit α-amino n-decanoic, homoserin, S-acetylaminomethyl-cystein, trans-3 và trans-4-hydroxyprolin, 4-aminophenylalanin, 4-nitrophenylalanin, 4-chlorophenylalanin, 4-carboxyphenylalanin, β-phenylserin β-hydroxyphenylalanin,

phenylglycine, α-naphthylalanin, cyclohexylalanin, cyclohexylglycine, axit indolin-2-carboxylic, axit 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-cacboxylic, axit aminomalonic, monoamit axit aminomalonic, N′-benzyl-N′-metyl-lysin, N′,N′-dibenzyl-lysin, 6-hydroxylysine, ornithine, axit α-aminocyclopentan carboxylic, axit α-aminocyclohexan carboxylic, axit α-aminocycloheptan cacboxylic, axit α- (2-amino-2-norbornane)-cacboxylic, axit α,γ-diaminobutyric, axit α,β-diaminopropionic, homophenylalanin, và α-tert-butylglycin.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế (bao gồm các phần chức năng và các biến thể chức năng) có thể được glycosyl hóa, amit hóa, carboxyl hóa, phosphoryl hóa, este hóa, N-acyl hóa, được tuần hoàn thông qua, ví dụ, cầu nối disulfua, hoặc chuyển đổi thành muối bổ sung axit và/hoặc tùy chọn được nhị trùng hóa hoặc polyme hóa, hoặc được liên hợp.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tổng hợp, tái tổ hợp, phân lập và/hoặc tinh chế.

"Liên kết cộng hóa trị" ở đây đề cập đến ví dụ như cầu nối disulfua hoặc liên kết peptit hoặc liên kết cộng hóa trị thông qua chất kết nối hoặc trình tự liên kết, ví dụ như chất kết nối polypeptit.

Thuật ngữ "chất kết nối" như được sử dụng ở đây đề cập đến một hoặc nhiều gốc axit amin được chèn vào giữa hai miền để cung cấp đủ độ linh động cho các miền, ví dụ trong các cấu trúc chuỗi đơn, giữa miền biến đổi thứ nhất và miền biến đổi thứ hai của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế và, tùy ý, giữa các miền biến đổi của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, gấp nếp chính xác để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên hoặc, trong trường hợp các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu, để hình thành vị trí liên kết kháng nguyên và ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên khác, ở dạng bắt cặp chéo (ở định dạng CODV hoặc ở một số định dạng diabody) hoặc ở kết cấu bắt cặp song song (ví dụ, ở định dạng DVD) của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Theo một số phương án, chất kết nối bao gồm 0 axit amin có nghĩa là không có chất kết nối. Chất kết nối được chèn vào lúc chuyển tiếp giữa các miền biến đổi hoặc giữa miền biến đổi và miền hằng định, tương ứng, ở cấp trình tự axit amin. Sự chuyển đổi giữa các miền có thể được xác định vì kích thước gần đúng của các miền globulin

miễn dịch cũng như của các miền TCR được hiểu rõ. Đã được những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực tương ứng biết rằng, vị trí chính xác của sự chuyển đổi miền có thể được xác định bằng cách xác định vị trí các đoạn peptit không tạo thành các phần tử cấu trúc thứ cấp như các tấm beta hoặc các xoắn alpha như được biểu thị bằng dữ liệu thực nghiệm hoặc có thể được xác định hoặc giả định sử dụng các kỹ thuật mô hình hóa hoặc dự đoán cấu trúc thứ cấp. Thuật ngữ chất kết nối được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến nhưng không bị giới hạn bởi các chất kết nối được đề cập đến như là L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 và L_6.

Chất kết nối, miễn là không được cụ thể hóa theo cách khác trong ngữ cảnh tương ứng, ví dụ như L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 và L_6, có thể có độ dài nằm trong khoảng từ ít nhất 1 đến 30 axit amin. Trong một số phương án, chất kết nối, ví dụ như L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 và L_6, có thể có độ dài nằm trong khoảng từ 2 đến 25, từ 2 đến 20, hoặc từ 3 đến 18 axit amin. Trong một số phương án, chất kết nối, ví dụ như L_1, L_2, L_3, L_5 và L_6, có thể là peptit có độ dài không quá 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, hoặc 5 axit amin. Trong các phương án khác, chất kết nối, ví dụ như L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 và L_6, có thể có độ dài nằm trong khoảng từ 5 đến 25, từ 5 đến 15, từ 4 đến 11, từ 10 đến 20 hoặc từ 20 đến 30 axit amin. Trong các phương án khác, chất kết nối, ví dụ như L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 và L_6, có thể có độ dài khoảng, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30 axit amin. Trong phương án cụ thể linkers, such as L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 and L_6, may be less than 24, less than 20, less than 16, is less than 12, less than 10, for example from 5 to 24, 10 to 24 or 5-10 amino acid residues in length. Theo một số phương án, chất kết nối này có chiều dài bằng 1 hoặc nhiều gốc axit amin, ví dụ như nhiều hơn 1, nhiều hơn 2, nhiều hơn 5, nhiều hơn 10, nhiều hơn 20 gốc axit amin, nhiều hơn 22 gốc axit amin.

Các chất kết nối mẫu, ví dụ như L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 và L_6, bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin bao gồm các trình tự axit amin

TVAAP (SEQ ID NO: 99), GGGS (SEQ ID NO: 100), GGGGS (SEQ ID NO: 101), GGSGG (SEQ ID NO: 140), TVLRT (SEQ ID NO: 102), TVSSAS (SEQ ID NO: 103), GGGSGGGG (SEQ ID NO: 96), GGGGSGT (SEQ ID NO: 148), GGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 141), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 104),

GGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 143), GGGGSAAA (SEQ ID NO: 105), GGGGSGGGGSGT (SEQ ID NO: 155) GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 106), GGGGSGGGGSGGGGSGT (SEQ ID NO: 161), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT (SEQ ID NO: 163), GGSGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 144), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT (SEQ ID NO: 165), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 107), GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG (SEQ ID NO: 145), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 108), GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 146), GGQGSGGTGSGGQGSGGTGSGGQGS (SEQ ID NO: 147), TVLSSAS (SEQ ID NO: 109) và GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 110), cụ thể, GGGSGGGG (SEQ ID NO: 96), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 110) và GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 108).

Thuật ngữ "miền F_c" như được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm các miền F_c nguyên bản và các biến thể và trình tự miền F_c như được định nghĩa thêm ở đây bên dưới. Cũng như các biến thể F_c và các phân tử F_c nguyên bản, thuật ngữ "miền F_c" bao gồm các phân tử ở dạng đơn phân hoặc đa phân, cho dù được phân hủy từ toàn bộ kháng thể hay được sản xuất bằng các phương tiện khác.

Thuật ngữ "F_c nguyên bản" như được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử bao gồm trình tự của đoạn liên kết không phải kháng nguyên sinh ra từ quá trình phân hủy kháng thể hoặc được tạo ra bằng các phương pháp khác, ở dạng đơn phân hoặc đa phân và có thể chứa vùng bản lề. Nguồn globulin miễn dịch ban đầu của F_c nguyên bản, cụ thể, có nguồn gốc từ con người và có thể là bất kỳ loại globulin miễn dịch nào, tốt hơn là IgG1 hoặc IgG2, tốt nhất là IgG1. Các phân tử F_c nguyên bản được tạo thành từ các polypeptit đơn phân có thể được liên kết thành các dạng nhị trùng hoặc đa trùng bằng liên kết cộng hóa trị (tức là liên kết disulfua) và liên kết không cộng hóa trị. Số lượng liên kết disulfua liên phân tử giữa các đơn vị con đơn phân của các phân tử F_c nguyên bản nằm trong khoảng từ 1 đến 4 tùy thuộc vào lớp (ví dụ, IgG, IgA và IgE) hoặc phân lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 và IgGA2). Một ví dụ về F_c nguyên bản là chất nhị trùng liên kết với disulfua tạo ra từ quá trình phân hủy papain của IgG.

Thuật ngữ "F_c nguyên bản" như được sử dụng ở đây là chung cho các dạng đơn trùng, nhị trùng và đa trùng. Một ví dụ về trình tự axit amin F_c nguyên bản là trình tự axit amin SEQ ID NO: 111, là trình tự axit amin F_c nguyên bản của IGHG1*01.

"Bản lề" hoặc "vùng bản lề" hoặc "miền bản lề" thường dùng để chỉ phần linh hoạt của chuỗi nặng nằm giữa miền C_{H1} và miền C_{H2}. Nó dài khoảng 25 axit amin và được chia thành "bản lề trên", "bản lề giữa" hoặc "bản lề lõi", và "bản lề dưới". "Miền phụ bản lề" đề cập đến chỉ bản lề trên, bản lề giữa (hoặc lõi) hoặc bản lề dưới. Trình tự axit amin của các bản lề của phân tử IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 được chỉ ra ở dưới đây:

IgG1: E_{216}PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 114)

IgG2: E_{216}RKCCVECPPCPAPPVAGP (SEQ ID NO: 115)

IgG3:ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE_{216}PKSCDTPPPCPRCPAPELLG (SEQ ID NO: 116)

IgG4: E_{216}SKYGPPCPSCPAPEFLG (SEQ ID NO: 117).

Trong ngữ cảnh của sáng chế, được đề cập đến các vị trí axit amin trong miền F_c, các vị trí hoặc gốc axit amin này được chỉ ra theo hệ thống đánh số của EU như được mô tả, ví dụ, trong Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969).

Thuật ngữ "biến thể F_c" như được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử hoặc trình tự được sửa đổi từ F_c nguyên bản nhưng vẫn bao gồm vị trí liên kết đối với thụ thể thu hồi, F_cRn (thụ thể F_c sơ sinh - neonatal F_c receptor). Các biến thể F_c ví dụ, và sự tương tác của chúng với thụ thể thu hồi, đã được biết đến trong lĩnh vực này. Do đó, thuật ngữ "biến thể F_c" có thể bao gồm phân tử hoặc trình tự được nhân hóa từ F_c nguyên bản không phải của con người. Hơn nữa, F_c nguyên bản bao gồm các vùng có thể bị loại bỏ vì chúng cung cấp các đặc điểm cấu trúc hoặc hoạt tính sinh học không cần thiết cho các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Do đó, thuật ngữ "biến thể F_c" bao gồm phân tử hoặc trình tự thiếu một hoặc nhiều vị trí hoặc phần còn lại F_c nguyên bản, hoặc trong đó một hoặc nhiều vị trí hoặc phần còn lại F_c đã được sửa đổi, ảnh hưởng hoặc liên quan đến: (1) sự hình thành liên kết disulfua, (2) sự không tương thích với tế bào chủ đã chọn, (3) sự không đồng nhất ở đầu cuối N khi biểu hiện trong tế bào chủ đã chọn, (4) sự glycosyl hóa, (5) tương tác với bổ thể, (6) sự liên kết với thụ

thể F_c không phải là thụ thể thu hồi, hoặc (7) độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC).

Theo đó, theo một phương án, miền F_c, ví dụ như F_{c1} và/hoặc F_{c2}, bao gồm miền bản lề.

Theo một phương án, miền F_c là miền F_c IgG của người, tốt hơn là được dẫn xuất từ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người, tốt hơn là IgG1 hoặc IgG2, tốt hơn nữa là IgG1.

Cụ thể, theo một số phương án, khi protein liên kết kháng nguyên bao gồm hai miền F_c, nghĩa là, ở định dạng TCER™ được mô tả ở bên dưới (ví dụ như F_{c1} và F_{c2}), thì hai miền F_c có thể thuộc cùng một loại isotype globulin miễn dịch hoặc phân lớp isotype hoặc của các isotype hoặc phân lớp isotype globulin miễn dịch khác nhau, tốt hơn là giống nhau. Theo đó, theo một số phương án, F_{c1} và F_{c2}, thuộc phân lớp IgG1, hoặc của phân lớp IgG2, hoặc của phân lớp IgG3, hoặc của phân lớp IgG4, tốt hơn là của phân lớp IgG1, hoặc của phân lớp IgG2, tốt hơn là của IgG1 lớp con.

Theo một số phương án, miền F_c là miền F_c biến thể và do đó bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin được mô tả ở bên dưới.

Theo một số phương án, miền F_c bao gồm hoặc chỉ chứa thêm đột biến "RF" và/hoặc "Núm thành lỗ", tốt hơn là "Núm thành lỗ".

"Đột biến RF" thường đề cập đến thay thế axit amin của các axit amin HY thành RF trong vùng C_{H3} của miền F_c, ví dụ như sự thay thế axit amin H435R và Y436F trong miền C_{H3} như được mô tả bởi Jendeberg, L. et al., (1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34) và được mô tả là có lợi cho mục đích tinh chế vì nó loại bỏ liên kết với protein A. Trong trường hợp protein liên kết kháng nguyên bao gồm hai miền F_c, đột biến RF có thể ở một hoặc cả hai, tốt nhất là ở một miền F_c.

"Núm-thành-lỗ" hay còn được gọi là công nghệ "núm-thành-lỗ" đề cập đến thay thế axit amin T366S, L368A và Y407V (lỗ) và T366W (núm) cả trong giao diện C_{H3}-C_{H3} để thúc đẩy sự hình thành heteromultimer. Các đột biến núm thành lỗ này có thể được ổn định hơn nữa bằng cách đưa vào các thay thế axit amin cystein bổ sung Y349C và S354C. Công nghệ "núm-thành-lỗ" cùng với sự thay thế ổn định axit amin cystein đã được mô tả trong các bằng sáng chế US5731168 và US8216805.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, đột biến "núm" cùng với thay thế axit amin cystein S354C, ví dụ, hiện diện trong miền F_c bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112 và đột biến "lỗ" cùng với thay thế axit amin cystein Y349C, ví dụ, hiện diện trong miền F_c bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113.

Theo một số phương án, miền F_c của một trong các polypeptit, ví dụ, F_{c1}, bao gồm thay thế axit amin T366W (Núm) trong miền C_{H3} của nó và miền F_c của polypeptit khác, ví dụ, F_{c2}, bao gồm thay thế axit amin T366S, L368A và Y407V (Lỗ) trong miền C_{H3} của nó, hoặc ngược lại.

Theo một số phương án, miền F_c của một trong các polypeptit, ví dụ, F_{c1}, bao gồm hoặc còn bao gồm thay thế axit amin S354C trong miền C_{H3} của nó và miền F_c của polypeptit khác, ví dụ, F_{c2}, bao gồm hoặc còn bao gồm thay thế axit amin Y349C trong miền C_{H3} của nó, hoặc ngược lại.

Theo một số phương án, miền F_c của một trong các polypeptit, ví dụ, F_{c1}, bao gồm thay thế axit amin S354C và T366W (Núm) trong miền C_{H3} của nó và miền F_c của polypeptit khác, ví dụ, F_{c2}, bao gồm thay thế axit amin Y349C, T366S, L368A và Y407V (Lỗ) trong miền C_{H3} của nó, hoặc ngược lại.

Tập hợp gồm các thay thế axit amin này có thể được mở rộng hơn nữa bằng cách bao gồm các thay thế axit amin K409A trên một polypeptit và F405K trong polypeptit khác như được mô tả bởi Wei et al., (Structural basis of a novel heterodimeric F_c for bispecific antibody production, Oncotarget. 2017). Theo đó, theo một số phương án, miền F_c của một trong các polypeptit, ví dụ, F_{c1}, bao gồm hoặc còn bao gồm thay thế axit amin K409A trong miền C_{H3} của nó và miền F_c của polypeptit khác, ví dụ, F_{c2}, bao gồm hoặc còn bao gồm thay thế axit amin F405K trong miền C_{H3} của nó, hoặc ngược lại.

Trong một số trường hợp, các cầu nối cystein được đưa vào nhân tạo có thể cải thiện tính ổn định của các protein liên kết kháng nguyên, một cách tối ưu mà không ảnh hưởng đến các đặc tính liên kết của các protein liên kết kháng nguyên. Những cầu nối cystein này có thể cải thiện hơn nữa quá trình dị phân tử hóa.

Các thay thế axit amin khác, ví dụ như thay thế cặp tích điện, đã được mô tả trong trình trạng kỹ thuật, ví dụ như trong EP 2 970 484 để cải thiện khả năng dị phân tử hóa của các protein tạo thành.

Theo đó trong một phương án, miền F_c của một trong các polypeptit, ví dụ F_{c1}, bao gồm hoặc còn bao gồm các thay thế cặp điện tích E356K, E356R, D356R, hoặc D356K và D399K hoặc D399R, và miền F_c của polypeptit khác, ví dụ, F_{c2}, bao gồm hoặc còn bao gồm các thay thế cặp điện tích R409D, R409E, K409E hoặc K409D và N392D, N392E, K392E hoặc K392D hoặc ngược lại.

Theo phương án khác, miền F_c trên một hoặc cả hai, tốt hơn là cả hai chuỗi polypeptit có thể bao gồm một hoặc nhiều biến đổi ức chế liên kết với thụ thể gamma F_c (F_c gamma receptor - FcyR). Những thay đổi như vậy có thể bao gồm L234A, L235A.

Với việc đưa các phần F_c bao gồm các miền bản lề, miền C_{H2} và C_{H3}, hoặc các phần của chúng, vào các protein liên kết kháng nguyên, cụ thể hơn là vào các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu, phát sinh vấn đề cố định không đặc hiệu của các phân tử này, do các tương tác thụ thể Fc:Fc-gamma gây ra (FcgR). Các FcgR bao gồm các phân tử bề mặt tế bào khác nhau (FcgRI, FcgRIIa, FcgRIIb, FcgRIII) liên kết với các độ bám dính khác nhau với các yếu tố quyết định kháng nguyên được hiển thị bởi các phần Fc của phân tử IgG. Vì sự cố định không đặc hiệu như vậy (nghĩa là không được tạo ra bởi một trong hai miền liên kết của phân tử nhị đặc hiệu), sự cố định là không thuận lợi do i) ảnh hưởng đến dược động học của một phân tử và ii) sự kích hoạt ngoài mục tiêu của các tế bào hiệu ứng miễn dịch khác nhau và các biến thể và đột biến Fc khác nhau để loại bỏ liên kết FcgR đã được xác định. Trong ngữ cảnh này, Morgan et al., 1995, Immunology (Đầu cuối N của miền C_{H2} của gen người IgG1 kháng HLA-DR cần thiết cho liên kết C1q, FcyRI và FcyRIII) bộc lộ sự trao đổi các gốc 233-236 của IgG1 của người với trình tự tương ứng được dẫn xuất từ IgG2 của người, nghĩa là, các phần còn lại 233P, 234V và 235A và trong đó không có axit amin nào ở vị trí 236, dẫn đến liên kết FcgRI bị loại bỏ, liên kết C1q bị phá bỏ và liên kết FcgRIII bị làm giảm. EP1075496 bộc lộ các kháng thể và các phân tử khác chứa F_c với các biến thể trong vùng F_c (ví dụ như một hoặc nhiều của 233P, 234V, 235A và không có phần còn lại hoặc G ở vị trí 236 và 327G, 330S và 331S) trong đó kháng thể tái tổ hợp có khả năng liên kết phân tử đích mà không kích hoạt sự ly giải phụ thuộc bổ thể đáng kể, hoặc sự phá hủy qua trung gian tế bào của mục tiêu.

Theo đó, theo một số phương án, vùng F_c bao gồm hoặc còn bao gồm một hoặc nhiều axit amin hoặc đứt đoạn được lựa chọn từ nhóm bao gồm 233P, 234V, 235A, 236 (Không có phần còn lại) hoặc G, 327G, 330S, 331S, tốt hơn là, vùng F_c bao gồm hoặc còn bao gồm các axit amin 233P, 234V, 235A, 236 (Không có phần còn lại) hoặc G và một hoặc nhiều axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm 327G, 330S, 331S, tốt nhất là, vùng F_c bao gồm hoặc còn bao gồm các axit amin 233P, 234V, 235A, 236 (Không có phần còn lại) và 331S.

Theo một phương án khác, miền F_c bao gồm hoặc còn bao gồm thay thế axit amin N297Q, N297G hoặc N297A, tốt hơn là N297Q.

Thay thế axit amin "N297Q", "N297G" hoặc "N297A" đề cập đến thay thế axit amin ở vị trí 297 mà thay thế vị trí N-Glycosyl hóa nguyên bản trong miền F_c. Thay thế axit amin này tiếp tục ngăn cản tương tác với thụ thể F_c -gamma và làm giảm sự biến đổi của các sản phẩm protein cuối cùng, tức là, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, do các phần còn lại đường như được mô tả ví dụ trong Tao, MH và Morrison, SL (J Immunol. 1989 Oct 15;143(8):2595-601.).

Theo một phương án khác, cụ thể là, khi không có chuỗi nhẹ, miền F_c bao gồm hoặc còn bao gồm thay thế axit amin S220C. Thay thế axit amin "S220C" loại bỏ cystein tạo thành cầu nối disulfua C_{H1}-CL.

Theo một số phương án, miền F_c bao gồm hoặc còn bao gồm ít nhất hai gốc cystein bổ sung, ví dụ, S354C và Y349C hoặc L242C và K334C, trong đó S354C nằm trong miền F_c của một polypeptit, ví dụ như F_{c1}, và Y349C nằm trong miền F_c của polypeptit khác, ví dụ như F_{c2}, để tạo ra dị phân tử và/hoặc trong đó L242C và K334C nằm trong cùng miền F_c, trong F_{c1} hoặc F_{c2} của một hoặc cả hai polypeptit để tạo thành cầu nội bộ C-C.

Với "được tinh chế" và "được phân lập", có nghĩa là, khi đề cập đến polypeptit (nghĩa là, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế) hoặc trình tự nucleotit, phân tử được chỉ định có mặt trong trường hợp cơ sở không có mặt các đại phân tử sinh học khác cùng loại. Thuật ngữ "được tinh chế" như được sử dụng ở đây cụ thể có nghĩa là có mặt ít nhất 75%, 85%, 95% hoặc 98% trọng lượng, của các đại phân tử sinh học cùng loại.

Phân tử axit nucleic "được phân lập" mà mã hóa polypeptit cụ thể đề cập đến phân tử axit nucleic về cơ bản không chứa các phân tử axit nucleic khác mà không mã hóa polypeptit chủ thể; tuy nhiên, phân tử có thể bao gồm một số bazơ hoặc phần phân tử bổ sung, mà không ảnh hưởng nghiêm trọng đến các đặc tính cơ bản của chế phẩm.

"Miền" có thể là bất cứ vùng nào của protein được xác định trên cơ sở các đồng đẳng trình tự và thường liên quan đến thực thể cấu trúc hoặc thực thể chức năng cụ thể.

Phân tử "tái tổ hợp" là phân tử đã được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương tiện tái tổ hợp.

Thuật ngữ "gen" có nghĩa là trình tự DNA mà mã hóa cho, hoặc tương ứng với, trình tự axit amin cụ thể bao gồm tất cả hoặc phần của một hoặc nhiều protein hoặc enzym, và có thể bao gồm hoặc không bao gồm trình tự DNA điều hòa, ví dụ như các trình tự chất xúc tác, mà, ví dụ, xác định các điều kiện mà gen được biểu hiện. Một số gen, không phải là gen cấu trúc, có thể được phiên mã từ ADN sang ARN, nhưng không được dịch mã thành trình tự axit amin. Các gen khác có thể hoạt động như những cơ quan điều hòa gen cấu trúc hoặc điều hòa quá trình phiên mã DNA. Cụ thể, thuật ngữ gen có thể được dùng cho trình tự gen mã hóa protein, tức là, trình tự bao gồm trình tự điều hòa, trình tự xúc tác, trình tự intron và exon.

Theo lý thuyết, "độ bám dính" được xác định bằng liên kết cân bằng giữa protein liên kết kháng nguyên và kháng nguyên, trong ngữ cảnh của sáng chế, bằng liên kết cân bằng giữa protein liên kết kháng nguyên và kháng nguyên của nó, cụ thể là peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein MHC. Độ bám dính có thể được biểu thị, ví dụ, ở nồng độ hiệu dụng nửa cực đại (EC_{50}) hoặc hằng định phân ly cân bằng (K_D).

"K_D" là hằng định phân ly cân bằng, tỷ lệ k_{off}/k_{on}, giữa protein liên kết kháng nguyên và kháng nguyên của nó. K_D và độ bám dính có quan hệ tỷ lệ nghịch với nhau. Giá trị K_D liên quan đến nồng độ của protein liên kết kháng nguyên và giá trị K_D càng thấp thì độ bám dính của protein liên kết kháng nguyên càng cao. Độ bám dính, tức là, giá trị K_D, có thể được đánh giá bằng thực nghiệm bằng nhiều phương pháp đã biết, ví dụ như đo lường tỷ lệ liên kết và phân ly với cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) hoặc đo lường giao thoa lớp sinh học (lớp sinh học

interferometry - BLI), như được mô tả chi tiết hơn ở bên dưới trong phần 'Các protein liên kết kháng nguyên'.

"Nồng độ hiệu dụng nửa cực đại" còn được gọi là "EC_{50}" thường đề cập đến nồng độ của phân tử gây ra phản ứng nửa chừng giữa mức cơ bản và mức tối đa sau thời gian tiếp xúc cụ thể. EC_{50} và độ bám dính có quan hệ tỷ lệ nghịch với nhau, giá trị EC_{50} càng thấp thì độ bám dính của phân tử càng cao. Trong một ví dụ, "EC_{50}" đề cập đến nồng độ của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế tạo ra phản ứng nửa chừng giữa mức cơ bản và mức tối đa sau thời gian tiếp xúc cụ thể, cụ thể hơn, đề cập đến nồng độ của protein liên kết kháng nguyên của sáng chế tạo ra phản ứng nửa chừng giữa mức cơ bản và mức tối đa sau thời gian tiếp xúc cụ thể. Các giá trị EC_{50} có thể được đánh giá bằng thực nghiệm bằng nhiều phương pháp đã biết, sử dụng ví dụ như xét nghiệm giải phóng IFN-gamma hoặc xét nghiệm giải phóng LDH như được mô tả chi tiết hơn ở đây trong phần "Các protein liên kết kháng nguyên".

"CD3" là phức hợp protein và bao gồm bốn chuỗi riêng biệt. Ở động vật có vú, phức hợp chứa chuỗi CD3γ, chuỗi CD3δ, và hai chuỗi CD3ε. Các chuỗi này liên kết với phân tử được gọi là thụ thể tế bào T (T cell receptor - TCR) và chuỗi ζ để tạo ra tín hiệu kích hoạt trong các tế bào lympho T.

"CD28" cũng được biểu hiện trên các tế bào T và có thể cung cấp các tín hiệu đồng kích thích, cần có để kích hoạt tế bào T. CD28 đóng vai trò quan trọng trong sự tăng sinh và tồn tại của tế bào T, sản xuất cytokin và phát triển hỗ trợ T loại 2.

"CD134" còn được gọi là OX40. CD134/OX40 được biểu hiện sau 24 đến 72 giờ sau khi kích hoạt và có thể được dùng để xác định phân tử đồng kích thích thứ cấp.

"4-1BB" có khả năng liên kết với phối tử 4-1BB trên tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell - APC), nhờ đó tín hiệu đồng kích thích tế bào T được tạo ra.

"CD5" là ví dụ khác về thụ thể chủ yếu được tìm thấy trên tế bào T, CD5 cũng được tìm thấy trên các tế bào B ở các mức độ thấp.

"CD95" là ví dụ khác về thụ thể thay đổi các chức năng của tế bào T và còn được biết đến là thụ thể Fas, mà trung gian cho việc tạo tín hiệu chết tế bào theo chương trình bởi phối tử Fas được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào khác. CD95 đã được

báo cáo là điều chỉnh các con đường tạo tín hiệu được gây ra bởi TCR/CD3 trong các tế bào lympho T đang nghỉ ngơi.

"Phân tử thụ thể đặc hiệu của tế bào NK" là, ví dụ, CD16, thụ thể Fc có độ bám dính thấp và NKG2D.

Ví dụ về phân tử thụ thể có trên bề mặt của cả các tế bào T và tế bào tiêu diệt tự nhiên (natural killer - NK) là CD2 và các thành viên khác của siêu họ CD2. CD2 có thể hoạt động như phân tử đồng kích thích trên các tế bào T và NK.

"Vùng xuyên màng" được đề cập trong (ii) ở trên đây trong ngữ cảnh của sáng chế có thể là, ví dụ, miền xuyên màng TCR alpha hoặc beta.

"Vùng tạo tín hiệu tế bào chất" có thể, ví dụ, là vùng nội bào TCR alpha hoặc beta.

"Tác nhân chẩn đoán" ở đây đề cập đến phân tử hoặc chất có thể phát hiện được, ví dụ như phân tử huỳnh quang, phân tử phóng xạ hoặc bất kỳ nhãn nào khác được biết đến trong lĩnh vực này mà cung cấp (trực tiếp hoặc gián tiếp) tín hiệu.

"Các phân tử huỳnh quang" được biết đến trong giải pháp kỹ thuật của lĩnh vực này bao gồm huỳnh quang isothiocyanat (fluorescein isothiocyanate - FITC), phycoerythrin (PE), các fluorophore để sử dụng trong tia laser xanh (ví dụ, PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 và APC hoặc Cy5, FL4), các fluorophore để sử dụng cho tia laser đỏ, tím hoặc uv (ví dụ, xanh Thái Bình Dương, cam Thái Bình Dương).

"Các phân tử phóng xạ" bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi nguyên tử phóng xạ cho các nghiên cứu xạ hình như I^{123}, I^{124}, In^{111}, Re^{186}, Re^{188}, Tc^{99}. Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cũng có thể bao gồm nhãn spin để tạo ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance - NMR) (còn được gọi là tạo ảnh cộng hưởng từ, magnetic resonance imaging - MRI), ví dụ như iốt-123, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ -15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các tác nhân chẩn đoán như vậy có thể được ghép trực tiếp (tức là, liên kết vật lý) với protein liên kết kháng nguyên hoặc có thể được liên kết gián tiếp.

"Chất trị liệu" ở đây đề cập đến chất có tác dụng trị liệu. Theo một phương án, chất trị liệu như vậy có thể là chất ức chế tăng trưởng, ví dụ như chất gây độc tế bào hoặc đồng vị phóng xạ.

"Chất ức chế tăng trưởng", hoặc "chất chống tăng sinh", có thể được sử dụng một cách trung tính, dùng để chỉ hợp chất hoặc chế phẩm ức chế sự phát triển của tế bào, đặc biệt là tế bào khối u, in vitro hoặc in vivo.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn chặn chức năng của tế bào và/hoặc gây ra sự phá hủy tế bào. Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" được dùng để bao gồm các chất trị liệu hóa học, enzym, kháng sinh và các chất độc như chất độc phân tử nhỏ hoặc chất độc hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các đoạn và/hoặc các biến thể của chúng, và các chất kháng u hoặc các chất chống ung thư khác nhau được bộc lộ dưới đây. Theo một số phương án, chất gây độc tế bào là taxoid, vincas, các taxane, maytansinoid hoặc chất tương tự maytansinoid như DM1 hoặc DM4, thuốc nhỏ, tomaymycin hoặc dẫn xuất pyrrolobenzodiazepine, dẫn xuất cryptophycin, dẫn xuất leptomycin, chất tương tự auristatin hoặc dolastatin, chất ức chế topoisomerase II, chất alkyl hóa DNA, chất chống tubulin, chất tương tự CC-1065 hoặc CC-1065.

Thuật ngữ "đồng vị phóng xạ" nhằm bao gồm các đồng vị phóng xạ thích hợp để điều trị ung thư, ví dụ như At^{211}, Bi^{212}, Er^{169}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, In^{111}, P^{32}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Sr^{89}, và đồng vị phóng xạ của Lu. Các đồng vị phóng xạ như vậy thường chủ yếu phát ra bức xạ beta. Theo phương án, đồng vị phóng xạ là đồng vị phát alpha, chính xác hơn là Thorium 227 phát ra bức xạ alpha.

"Phần phân tử sửa đổi PK" ở đây đề cập đến phần phân tử thay đổi dược động học (PK) của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo đó, phần phân tử sửa đổi cụ thể là thời gian bán hủy in vivo và sự phân bố của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo phương án được ưu tiên, phần phân tử thay đổi PK làm tăng thời gian bán hủy của protein liên kết kháng nguyên. Các ví dụ về các phần phân tử thay đổi PK bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, PEG (Dozier et al., (2015) Int J Mol Sci. Oct 28;16(10):25831-64 and Jevsevar et al., (2010) Biotechnol J.Jan;5(1):113-28), PASylation (Schlapschy et al., (2013) Protein Eng Des Sel. Aug;26(8):489-501), albumin (Dennis et al., (2002) J Biol Chem. Sep 20;277(38):35035-43), the F_c-part of an antibody and/or unstructured polypeptits (Schellenberger et al., (2009) Nat Biotechnol. Dec; 27(12):1186-90).

"Thời gian bán hủy"($T_{1/2}$)" nói chung đề cập đến thời gian cần thiết để một nửa của lượng của thuốc hoặc chất khác được lắng đọng trong sinh vật sống được chuyển hóa hoặc loại bỏ bởi các quá trình sinh học bình thường. Thời gian bán hủy trong ngữ cảnh của sáng chế do đó đề cập đến khoảng thời gian cần thiết để một nửa của lượng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bị loại bỏ trong,ví dụ, chuột. Thời gian bán hủy có thể được xác định bằng các phương pháp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực tương ứng. Trong một ví dụ, thời gian bán hủy được xác định như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 10. Theo đó, trong một ví dụ, thời gian bán hủy được xác định bằng cách sử dụng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cho, ví dụ, chuột, ví dụ như chuột thiếu NOG siêu miễn dịch, ví dụ, bằng cách tiêm tĩnh mạch, sau đó thu thập mẫu huyết tương, ví dụ, từ đám rối retro-bulbar, tại các thời điểm khác nhau, ví dụ, tại các thời điểm 0 giờ, 0,1 giờ, 2 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 120 giờ, 240 giờ và 360 giờ. Sau đó, mức độ huyết tương của protein liên kết kháng nguyên được xác định bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ như ELISA, sử dụng các thiết lập khác nhau, ví dụ như xét nghiệm F_c - VL và xét nghiệm CD3 - pMHC. Nồng độ trong huyết tương của các mẫu thường thu được bằng phép nội suy từ các đường cong chuẩn tương ứng và thời gian bán hủy, sau đó thường được xác định bằng phép hồi quy tuyến tính của các nồng độ trong huyết tương thu được tại các thời điểm khác nhau.

Các protein liên kết kháng nguyên

Sử dụng TCR R7P1D5, như được bộc lộ trong WO 2017/158103 làm điểm khởi đầu, các tác giả sáng chế đã thiết kế, sản xuất và thử nghiệm biến thể miền alpha (Valpha) biên đổi TCR và biến thể miền beta (Vbeta) biến đổi tùy chọn ở định dạng chuỗi đơn (scTCR) bằng cách sử dụng xét nghiệm sàng lọc nấm men như được mô tả trong ví dụ 1 và 2 hoặc trong cấu trúc TCR nhị đặc hiệu chuỗi đơn để tối ưu hóa hơn nữa đối với độ bám dính liên kết cũng như năng suất và độ ổn định của cấu trúc scTCR nhị đặc hiệu hòa tan như được mô tả trong ví dụ 4 ở đây. Bằng cách này, các tác giả sáng chế đã phát hiện được các biến thể khác nhau của miền alpha biến đổi và miền beta tùy chọn, cụ thể hơn là các biến thể khác nhau của CDRa3 (với 5 biến thể) của miền alpha biến đổi có thể được kết hợp một cách có lợi với CDRa1, CDRa2, CDRb1, CDRb2 và/hoặc CDRb3 của TCR mẹ hoặc với bất kỳ biến thể CDR nào được phát hiện cho CDRa1 (1 biến thể), CDRa2 (3 biến thể), CDRb1 (1 biến thể), CDRb2

(5 biến thể) và/hoặc CDRb3 (1 biến thể) mà là những biến thể có lợi cho các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế để liên kết mục tiêu, tức là, peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là phức hợp với HLA-A*02, có độ bám dính cao nhưng cũng có tính đặc hiệu cao.

Các tác giả sáng chế đã chứng minh trong các ví dụ rằng CDR có thể được sử dụng trong các TCR cho ACT, cấu trúc TCR chuỗi đơn cũng như trong các định dạng đặc nhị hiệu kép và, do đó, đã được thể hiện bằng bằng chứng về nguyên lý rằng các biến thể CDR được phát hiện có thể được sử dụng để tạo ra các protein liên kết kháng nguyên khác nhau có độ bám dính cao nhưng cũng có tính đặc hiệu cao với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein MHC, tốt nhất là phức hợp với HLA-A*02.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc đột biến khung của miền biến đổi alpha (Valpha) và biến đổi beta (Vbeta) TCR cải thiện tính đặc hiệu liên kết cũng như năng suất và độ ổn định của các cấu trúc scTCR hòa tan, nhị đặc hiệu như được mô tả trong ví dụ 4 ở đây.

Trong ví dụ từ 5 đến 8, các tác giả sáng chếa đã thiết kế, thể hiện và thử nghiệm thành công hiệu quả in vitro và in vivo chống lại các dòng tế bào khối u, ví dụ như các protein liên kết kháng nguyên ở định dạng TCER™, liên kết cụ thể với phức hợp TCR-CD3 của người và với phức hợp peptit:MHC bao gồm peptit MAGE-A của SEQ ID NO: 1 được liên kết với các phân tử MHC lớp I, ví dụ, HLA-A*02:01. Để nhắm đến phức hợp TCR-CD3, các miền V_H và V_L có nguồn gốc từ kháng thể được nhân hóa, đặc hiệu với CD3 hUCHT1 được mô tả bởi Zhu e et al., (J Immunol, 1995, 155, 1903–1910) hoặc kháng thể đặc hiệu TCR alpha/beta BMA031 được mô tả trong Shearman et al., (J Immunol, 1991, 147, 4366-73) được sửa đổi và sử dụng trong các ví dụ đó. Để nhắm đến phức hợp MAGE-A:MHC, các miền Valpha và Vbeta bao gồm các CDR như được mô tả ở đây có thể được tận dụng để tạo ra các protein liên kết kháng nguyên bão hòa độ bám dính và ổn định. Các miền VL và VH, Valpha và Vbeta giống nhau được tiếp tục sử dụng trong định dạng thụ thể tế bào T chuỗi đơn của người bao gồm miền Fab (bao gồm bản lề C_{H1}- và C_L) như được mô tả trong ví dụ 4.

Theo đó, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên mà liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1, trong đó peptit kháng nguyên này nằm trong phức hợp với protein MHC, protein liên kết kháng nguyên bao gồm:

(a) chuỗi polypeptit thứ nhất chứa miền biến đổi thứ nhất bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó

- CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'X_1SSSTY' SEQ ID NO: 72, trong đó X_1 là axit amin bất kỳ, tốt hơn là D hoặc E, tốt hơn nữa là E, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 72 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bằng một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'IX_1S$X_2$$X_3DX_4$' SEQ ID NO: 73, trong đó X_1 đến X_4 là axit amin bất kỳ, và trong đó tốt hơn là X_1 là F hoặc Y, tốt hơn nữa là Y, X_2 là N hoặc S, tốt hơn nữa là S, X_3 là Q hoặc M, tốt hơn nữa là Q và X_4 là M, V, S hoặc Q, tốt hơn là S hoặc Q, tốt hơn nữa là Q.

- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAE$X_1$$X_2SX_3$SKIIF' SEQ ID NO: 74, trong đó X_1 đến X_3 là axit amin bất kỳ, và trong đó tốt hơn là X_1 là A, F hoặc M, tốt hơn nữa là M, X_2 là S, T hoặc N, tốt hơn nữa là T, và tốt hơn X_3 là E hoặc A, tốt hơn là E, với điều kiện CDRa3 không bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAEYSSASKIIF' (SEQ ID NO: 7) nếu CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, tốt hơn là với điều kiện CDRa3 không bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAEYSSASKIIF' (SEQ ID NO: 7), hoặc

- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAE$X_1$$X_2SX_3$SKIIF' SEQ ID NO: 77, trong đó X_1 đến X_3 là axit amin bất kỳ, và trong đó tốt hơn là X_1 là F, M hoặc A, tốt hơn là M, và, tốt hơn X_2 là S, T hoặc N, tốt hơn nữa là T, và tốt hơn X_3 là E hoặc A, tốt hơn là E, và

(b) chuỗi polypeptit thứ hai chứa miền biến đổi thứ hai bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó

- CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'X_1GHDY' SEQ ID NO: 78, trong đó X_1 là axit amin bất kỳ, tốt hơn là S hoặc P, tốt hơn nữa là P, hoặc

trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 78, bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'FX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$P' SEQ ID NO: 79, trong đó X$_1$ đến X$_4$ là axit amin bất kỳ, và trong đó tốt hơn là X$_1$ là C hoặc N, tốt hơn nữa là C, tốt hơn X$_2$ là Y hoặc N, tốt hơn nữa là Y, tốt hơn X$_3$ là G hoặc N, tốt hơn nữa là G, tốt hơn X$_4$ là H, V, T, A hoặc M, tốt hơn là H hoặc T, tốt nhất là T, trong đó tốt hơn là, khi X$_1$ là C, trình tự axit amin FR3-b bao gồm axit amin 66C tại vị trí axit amin 66, và

- CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CASRAX$_1$TGELFF' SEQ ID NO: 82, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là D hoặc N, tốt hơn là D, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 82, bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên mà liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1, trong đó peptit kháng nguyên này nằm trong phức hợp với protein MHC, protein liên kết kháng nguyên bao gồm

(a) chuỗi polypeptit thứ nhất chứa miền biến đổi thứ nhất bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó

- CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 5 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bằng một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 6 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAEX$_1$X$_2$SX$_3$SKIIF' SEQ ID NO: 77, trong đó X$_1$ đến X$_3$ là axit amin bất kỳ, và trong đó tốt hơn là X$_1$ là A, F hoặc M, tốt hơn nữa là M, tốt hơn X$_2$ là S, T hoặc N, tốt hơn nữa là T, và tốt hơn X$_3$ là E hoặc A, tốt hơn là E, với điều kiện CDRa3 không bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự

axit amin 'CAEYSSASKIIF' (SEQ ID NO: 7) nếu CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, tốt hơn là với điều kiện CDRa3 không bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAEYSSASKIIF' (SEQ ID NO: 7), hoặc

- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAE$X_1X_2SX_3$SKIIF' SEQ ID NO: 77, trong đó X_1 đến X_3 là axit amin bất kỳ, và tốt hơn là X_1 là F, M hoặc A, tốt hơn là M, và, tốt hơn X_2 là S, T hoặc N, tốt hơn nữa là T, và tốt hơn X_3 là E hoặc A, tốt hơn là E, và

(b) chuỗi polypeptit thứ hai chứa miền biến đổi thứ hai bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó

- CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 12, bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 13 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 14 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên có thể hòa tan, mà liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1, trong đó peptit kháng nguyên này nằm trong phức hợp với protein MHC, protein liên kết kháng nguyên bao gồm

(a) chuỗi polypeptit thứ nhất chứa miền biến đổi thứ nhất bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó

- CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'X_1SSSTY' SEQ ID NO: 72, trong đó X_1 là axit amin bất kỳ, tốt hơn là D hoặc E, tốt hơn nữa là E, hoặc

trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 72 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bằng một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'IYSSQDX$_1$' SEQ ID NO: 74, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Q, V hoặc S, tốt hơn nữa là Q,

- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAEMTSESKIIF' SEQ ID NO: 35, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 35 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai, ba hoặc bốn thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

(b) chuỗi polypeptit thứ hai chứa miền biến đổi thứ hai bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó

- CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'X$_1$GHDY' SEQ ID NO: 78, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là S hoặc P, tốt hơn nữa là P, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 78 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

- CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'FCYGX$_1$P' SEQ ID NO: 81, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là H, V, A hoặc T, tốt hơn là T, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 81 bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một thay thế axit amin, và trong đó tốt hơn là khi CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'FCYGX$_1$P' SEQ ID NO: 81 trình tự axit amin FR3-b bao gồm axit amin 66C tại vị trí axit amin 66,

- CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CASRAX$_1$TGELFF' SEQ ID NO: 82, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là D hoặc N, tốt hơn là D, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 82, bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai thay thế axit amin, ví dụ như một thay thế axit amin,

Như được chỉ ra ở trên, theo một số phương án, các trình tự axit amin CDRb2 bao gồm axit amin 57C ở vị trí 57, axit amin này tốt hơn là tạo cầu disunfit với cystein tốt hơn là có mặt ở vị trí 66 của trình tự axit amin FR3b. Theo đó, theo các phương án được ưu tiên, khi trình tự axit amin CDRb2 bao gồm ở vị trí 57 là axit amin 57C thì

trình tự axit amin FR3-b, tốt hơn là, bao gồm ở vị trí axit amin 66 là axit amin 66C và ngược lại. Theo một số phương án, trình tự axit amin FR3b do đó tốt hơn là bao gồm thay thế axit amin ở vị trí 66 này, theo đó, theo một số phương án liên quan, trình tự axit amin FR3b bao gồm thay thế axit amin I66C.

Theo một số phương án, CDRa1 theo sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 55.

Theo một số phương án, CDRa2 theo sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:

'IYSSQDX$_1$' SEQ ID NO: 74, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Q, V hoặc S, tốt hơn nữa là Q, hoặc SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 74 hoặc SEQ ID NO: 6 bởi ít nhất một thay thế axit amin, ví dụ như bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một thay thế axit amin, tốt hơn là CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'IYSSQDX$_1$' SEQ ID NO: 74 trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Q, V hoặc S, tốt hơn nữa là Q, hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 74, bởi ít nhất một thay thế axit amin, ví dụ như một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn nữa là một thay thế axit amin.

Theo một số phương án, CDRa2 trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của được lựa chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 56, 57 và 59, tốt hơn là SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 56.

Theo một số phương án, CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của được lựa chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38 và 39, tốt hơn là SEQ ID NO: 35.

Theo một số phương án, CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 62.

Theo một số phương án, CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin:

- 'FNNNVP' SEQ ID NO: 13, hoặc
- 'FCYGX$_1$P' SEQ ID NO: 81, trong đó X$_1$ là axit amin bất kỳ, tốt hơn là H, V, A hoặc T, tốt hơn nữa là T, và trong đó, tốt hơn là, khi CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa axit amin FCYGX$_1$P' SEQ ID NO: 81 trình tự axit amin FR3-b bao gồm axit amin 66C tại vị trí axit amin 66, hoặc

trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 13 hoặc 81 bởi ít nhất một thay thế axit amin, ví dụ như một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn nữa là một thay thế axit amin.

Theo một số phương án, CDRb2 trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của được lựa chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 63, 64, 65. 66 và 70, tốt hơn là, SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 65, và trong đó tốt hơn là, khi CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66 hoặc 70, trình tự axit amin FR3-b tốt hơn là bao gồm axit amin 66C tại vị trí axit amin 66.

Theo một số phương án, CDRb3 trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 hoặc SEQ ID NO: 71.

Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm

(a) chuỗi polypeptit thứ nhất chứa miền biến đổi thứ nhất bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó

- CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5,
- CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, và
- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, tốt hơn là SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, tốt hơn nữa là SEQ ID NO: 35 và 38, ví dụ, SEQ ID NO: 35 và trong đó

(b) chuỗi polypeptit thứ hai chứa miền biến đổi thứ hai bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó

- CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 12
- CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, và
- CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14.

Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm

(a) chuỗi polypeptit thứ nhất chứa miền biến đổi thứ nhất bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó

- CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 55, tốt hơn là SEQ ID NO. 55,

- CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 56, 57 và 59, tốt hơn là, SEQ ID NO: 56 và 59, tốt hơn nữa là, SEQ ID NO: 56,

- CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:35,

(b) chuỗi polypeptit thứ hai chứa miền biến đổi thứ hai bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó

- CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 62,

- CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 63, 64, 65. 66 và 70, tốt hơn là, SEQ ID NO: 65, và trong đó tốt hơn là, khi CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66 hoặc 70, trình tự axit amin FR3-b tốt hơn là bao gồm axit amin 66C tại vị trí axit amin 66, và

- CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 hoặc SEQ ID NO: 71, tốt hơn là SEQ ID NO. 71.

Sáng chế còn đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên bao gồm các biến thể của trình tự axit amin CDR được bộc lộ trong ngữ cảnh của sáng chế, điển hình là các biến thể của CDRa1, CDRa2, CDRa3, CDRb1, CDRb2 và/hoặc CDRb3, các biến thể này có thể bao gồm ít nhất một, ví dụ như bốn, ba, hai, hoặc một, tốt hơn là một, hai hoặc ba thay thế axit amin trong đó số lần thay thế axit amin được ưu tiên tốt hơn là phụ thuộc vào độ dài của CDR tương ứng.

Theo đó, theo một số phương án, CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin CDRa1 được bộc lộ ở đây bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai amin thay thế axit, hoặc chỉ một thay thế axit amin, trong đó thay thế axit amin nói trên tốt hơn là ở bất kỳ vị trí axit amin nào trong số các vị trí 28, 29, 36, 37 và 38, tốt hơn nữa là ở vị trí 28.

Theo một số phương án, CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin CDRa2 được bộc lộ ở đây bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai amin thay thế axit, hoặc chỉ một thay thế axit amin, trong đó thay thế axit amin nói trên tốt hơn là ở vị trí 56 hoặc 65, tốt hơn nữa là ở vị trí 65.

Theo một số phương án, CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin CDRa3 được bộc lộ ở đây bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai, ba hoặc bốn thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai amin thay thế axit, hoặc chỉ một thay thế axit amin, trong đó thay thế axit amin nói trên tốt hơn là ở bất kỳ vị trí axit amin nào trong số các vị trí 105, 106, 107, 108, 109, 113, 114, 115, 116 và 117.

Theo một số phương án, CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin CDRb1 được bộc lộ ở đây bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai amin thay thế axit, ví dụ như một thay thế axit amin, trong đó thay thế axit amin nói trên tốt hơn là ở bất kỳ vị trí axit amin nào trong số các vị trí 27, 28, 29, 37 và 38, tốt hơn nữa là ở vị trí 27 và 38.

Theo một số phương án, CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin CDRb2 được bộc lộ ở đây bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai hoặc ba thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai amin thay thế axit, hoặc chỉ một thay thế axit amin, trong đó thay thế axit amin nói trên tốt hơn là ở vị trí 65.

Theo một số phương án, CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin CDRb3 được bộc lộ ở đây bởi ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một, hai, ba hoặc bốn thay thế axit amin, tốt hơn là bởi một hoặc hai amin thay thế axit, hoặc chỉ một thay thế axit amin, trong đó thay thế axit amin nói trên tốt hơn là ở bất kỳ vị trí axit amin nào trong số các vị trí 105, 106, 107, 108, 109, 113, 114, 115, 116, 117.

Thay thế axit amin được đề cập ở trên được xác định ở trên trong phần 'định nghĩa', tốt hơn là các thay thế axit amin là thay thế axit amin bảo toàn.

Như những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ hiểu, miền biến đổi thứ nhất bao gồm trình tự axit amin CDR như được xác định ở đây và miền biến đổi thứ hai bao gồm trình tự axit amin CDR như được xác định ở đây, cùng nhau tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó vị trí liên kết kháng nguyên nói trên liên kết với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với protein MHC.

Ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3 được dẫn xuất từ miền alpha biến đổi của TCR. Theo đó, vì sẽ được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, theo một số phương án, miền biến đổi thứ nhất cũng có thể được gọi là miền alpha biến đổi. Tương tự như vậy, ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3 được dẫn xuất từ miền beta biến đổi của TCR nói trên, và do đó, sẽ được hiểu thêm bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, rằng miền biến đổi thứ hai cũng có thể là được gọi là miền beta biến đổi. Cụ thể hơn, miền biến đổi thứ nhất bao gồm trình tự axit amin khung biến đổi alpha và các CDR biến đổi alpha như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, ví dụ như trình tự (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)- (CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a) có thể được đề cập đến như là miền alpha biến đổi và/hoặc miền biến đổi thứ hai bao gồm trình tự axit amin khung biến đổi beta và các CDR biến đổi beta như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, ví dụ như trình tự (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b) có thể được đề cập đến như là miền beta biến đổi.

Theo một số phương án, các CDR có thể được ghép theo trình tự khung kháng thể. Theo đó, trong một ví dụ, các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của miền biến đổi thứ nhất có thể được ghép trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, miền biến đổi thứ nhất do đó bao gồm hoặc chỉ chứa các trình tự (FR1-L)-(CDRa1)-(FR2-L)-(CDRa2)-(FR3-L)-(CDRa3)-(FR4-L) và có thể được đề cập đến như là miền biến đổi chuỗi nhẹ. Trong cùng ví dụ, các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của miền biến đổi thứ hai có thể được ghép trong miền biến đổi chuỗi nặng, miền biến đổi thứ hai do đó bao gồm hoặc chỉ chứa các trình tự (FR1-H)-(CDRb1)-(FR2-H)–(CDRb2)-(FR3-H)–(CDRb3)-(FR4-H) và có thể được đề cập đến như là miền biến đổi chuỗi nặng. Tuy nhiên, người có hiểu biết về lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của miền biến đổi thứ nhất có thể được ghép trong miền biến đổi chuỗi nặng và các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của miền biến đổi thứ hai có thể được ghép trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, các cân nhắc ở trên áp dụng mutatis mutandis.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, các CDR của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế khác với các CDR của TCR R7P1D5 mẹ và nguyên bản, như được bộc lộ trong WO 2017/158103, ít nhất là trong trình tự axit amin CDRa3 của TCR mẹ nói

trên R7P1D5. Vì sẽ được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, CDRa3, như được xác định ở trên, không bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CAEYSSASKIIF' (SEQ ID NO: 7) mà là CDRa3 của TCR mẹ R7P1D5.

Theo một phương án, miền biến đổi thứ nhất và miền biến đổi thứ hai như được xác định ở đây trong ngữ cảnh các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể bao gồm thay thế axit amin ở vị trí 44 theo cách đánh số IMGT. Theo phương án được ưu tiên, axit amin ở vị trí 44 này được thay thế bằng axit amin thích hợp khác, để cải thiện việc bắt cặp. Theo các phương án cụ thể, tốt hơn là trong đó protein liên kết kháng nguyên là TCR, thay thế axit amin này cải thiện, ví dụ, sự bắt cặp của các chuỗi (nghĩa là, sự bắt cặp của các chuỗi α và β hoặc sự bắt cặp của γ và δ trong phương án được ưu tiên, một hoặc cả hai trong số các axit amin có ở vị trí 44 trong miền biến đổi thứ nhất ($v_1$44) và axit amin có ở vị trí 44 trong miền biến đổi thứ hai ($v_2$44) được thay thế thành các cặp axit amin $v_1$44/$v_2$44 được lựa chọn từ nhóm các cặp axit amin bao gồm $v_1$44D/$v_2$44R, $v_1$44R/$v_2$44D, $v_1$44E/$v_2$44K, $v_1$44K/$v_2$44E, $v_1$44D/$v_2$44K, $v_1$44K/$v_2$44D, $v_1$44R/$v_2$44E; $v_1$44E/$v_2$44R, $v_1$44L/$v_2$44W, $v_1$44W/$v_2$44L, $v_1$44V/$v_2$44W, $v_1$44W/$v_2$44V.

Theo đó, theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có thể còn bao gồm một trong số các cặp thay thế được ưu tiên ($v_1$44/$v_2$44) được lựa chọn từ nhóm bao gồm: v_1Q44D/v_2Q44R; v_1Q44R/v_2Q44D; v_1Q44E/v_2Q44K; v_1Q44K/v_2Q44E; v_1Q44D/v_2Q44K; v_1Q44K/v_2Q44D; v_1Q44E/v_2Q44R; v_1Q44R/v_2Q44E; v_1Q44L/v_2Q44W; v_1Q44W/v_2Q44L; v_1Q44V/v_2Q44W; và v_1Q44W/v_2Q44V; v_1W44D/v_2Q44R; v_1W44R/v_2Q44D; v_1W44E/v_2Q44K; v_1W44K/v_2Q44E; v_1W44D/v_2Q44K; v_1W44K/v_2Q44D; v_1W44E/v_2Q44R; v_1W44R/v_2Q44E; v_1W44L/v_2Q44W; v_1W44/v_2Q44L; v_1W44V/v_2Q44W; và v_1W44/v_2Q44V; v_1H44D/v_2Q44R; v_1H44R/v_2Q44D; v_1H44E/v_2Q44K; v_1H44K/v_2Q44E; v_1H44D/v_2Q44K; v_1H44K/v_2Q44D; v_1H44E/v_2Q44R; v_1H44R/v_2Q44E; v_1H44L/v_2Q44W; v_1H44W/v_2Q44L; v_1H44V/v_2Q44W; và v_1H44W/v_2Q44V; v_1K44D/v_2Q44R; v_1K44R/v_2Q44D; v_1K44E/v_2Q44K; v_1K44/v_2Q44E; v_1K44D/v_2Q44K; v_1K44/v_2Q44D; v_1K44E/v_2Q44R; v_1K44R/v_2Q44E; v_1K44L/v_2Q44W; v_1K44W/v_2Q44L; v_1K44V/v_2Q44W; và v_1K44W/v_2Q44V; v_1E44D/v_2Q44R; v_1E44R/v_2Q44D; v_1E44/v_2Q44K; v_1E44K/v_2Q44E;

v_1E44D/v_2Q44K; v_1E44K/v_2Q44D; v_1E44/v_2Q44R; v_1E44R/v_2Q44E; v_1E44L/v_2Q44W; v_1E44W/v_2Q44L; v_1E44V/v_2Q44W; và v_1E44W/v_2Q44V; v_1Q44D/v_2R44; v_1Q44R/v_2R44D; v_1Q44E/v_2R44K; v_1Q44K/v_2R44E; v_1Q44D/v_2R44K; v_1Q44K/v_2R44D; v_1Q44E/v_2R44; v_1Q44R/v_2R44E; v_1Q44L/v_2R44W; v_1Q44W/v_2R44L; v_1Q44V/v_2R44W; và v_1Q44W/v_2R44V; v_1W44D/v_2R44; v_1W44R/v_2R44D; v_1W44E/v_2R44K; v_1W44K/v_2R44E; v_1W44D/v_2R44K; v_1W44K/v_2R44D; v_1W44E/v_2R44; v_1W44R/v_2R44E; v_1W44L/v_2R44W; v_1W44/v_2R44L; v_1W44V/v_2R44W; và v_1W44/v_2R44V; v_1H44D/v_2R44; v_1H44R/v_2R44D; v1H44E/v_2R44K; v_1H44K/v_2R44E; v_1H44D/v_2R44K; v_1H44K/v_2R44D; v_1H44E/v_2R44; v_1H44R/v_2R44E; v_1H44L/v_2R44W; v_1H44W/v_2R44L; v_1H44V/v_2R44W; và v_1H44W/v_2R44V; v_1K44D/v_2R44; v_1K44R/v_2R44D; v_1K44E/v_2R44K; v_1K44/v_2R44E; v_1K44D/v_2R44K; v1K44/v_2R44D; v_1K44E/v_2R44; v_1K44R/v_2R44E; v_1K44L/v_2R44W; v_1K44W/v_2R44L; v1K44V/v2R44W; và v_1K44W/v_2R44V; v_1E44D/v_2R44; v_1E44R/v_2R44D; v_1E44/v_2R44K; v_1E44K/v_2R44E; v_1E44D/v_2R44K; v_1E44K/v_2R44D; v_1E44R/v_2R44E; v_1E44L/v_2R44W; v_1E44W/v_2R44L; v_1E44V/v_2R44W; và v_1E44W/v_2R44V; v_1Q44D/v_2K44R; v_1Q44R/v_2K44D; v_1Q44E/$v_2$44K; v_1Q44K/v_2K44E; v_1Q44D/$v_2$44K; v_1Q44K/v_2K44D; v_1Q44E/v_2K44R; v_1Q44R/v_2K44E; v_1Q44L/v_2K44W; v_1Q44W/v_2K44L; v_1Q44V/v_2K44W; và v_1Q44W/v_2K44V; v_1W44D/v_2K44R; v_1W44R/v_2K44D; v_1W44E/$v_2$44K; v_1W44K/v_2K44E; v_1W44D/$v_2$44K; v_1W44K/v_2K44D; v_1W44E/v_2K44R; v_1W44R/v_2K44E; v_1W44L/v_2K44W; v_1W44/v_2K44L; v_1W44V/v_2K44W; và v_1W44/v_2K44V; v_1H44D/v_2K44R; v_1H44R/v_2K44D; v_1H44E/$v_2$44K; v_1H44K/v_2K44E; v_1H44D/$v_2$44K; v_1H44K/v_2K44D; v_1H44E/v_2K44R; v_1H44R/v_2K44E; v_1H44L/v_2K44W; v_1H44W/v_2K44L; v_1H44V/v_2K44W; và v_1H44W/v_2K44V; v_1K44D/v_2K44R; v_1K44R/v_2K44D; v_1K44E/$v_2$44K; v_1K44/v_2K44E; v_1K44D/$v_2$44K; v_1K44/v_2K44D; v_1K44E/v_2K44R; v_1K44R/v_2K44E; v_1K44L/v_2K44W; v_1K44W/v_2K44L; v_1K44V/v_2K44W; và v_1K44W/v_2K44V; v_1E44D/v_2K44R; v_1E44R/v_2K44D; v_1E44/$v_2$44K; v_1E44K/v_2K44E; v_1E44D/$v_2$44K; v_1E44K/v_2K44D; v_1E44/v_2K44R; v_1E44R/v_2K44E; v_1E44L/v_2K44W; v_1E44W/v_2K44L; v_1E44V/v_2K44W; và v_1E44W/v_2Q44V.

Ví dụ, trong phần trên, "v_1Q44R/v_2Q44D" có nghĩa là, trong miền biến đổi thứ nhất Q44 được thay thế bởi R, trong khi trong miền biến đổi thứ hai, Q44 được thay thế bởi D. Có thể tìm thấy các thay thế bổ sung và mô tả trong Đơn đăng ký Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2018-0162922.

Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng các CDR thu được ban đầu từ các miền biến đổi alpha và beta TCR có thể được sử dụng trong các protein liên kết kháng nguyên có định dạng khác với các TCR nguyên bản. Ví dụ, trong phần thử nghiệm, các tác giả sáng chế đã sử dụng CDR của các miền biến đổi alpha và beta TCR ở định dạng TCER™, như được mô tả chi tiết ở dưới và như được hiển thị trong các ví dụ (nghĩa là, ví dụ 6).

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã sử dụng các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế trong các cấu trúc TCR chuỗi đơn, ví dụ như TCR nhị đặc hiệu bao gồm scTCR, hoặc scTCR ổn định Fab, bao gồm polypeptit thứ nhất với V_H(CD3)-C_{H1}-Valpha-L_z-Vbeta và polypeptit thứ hai với V_L(CD3)-C_L trong đó V_H(CD3), V_L(CD3), Valpha và Vbeta như được định nghĩa ở trên và L_z là chất kết nối bao gồm trình tự axit amin GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS có SEQ ID NO: 108 và C_{H1} là miền hằng định của chuỗi nặng và C_L là miền hằng định của chuỗi nhẹ (ví dụ 4).

Theo đó, những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này hiểu từ các thí nghiệm này như là bằng chứng về nguyên tắc rằng các CDR như được xác định ở đây trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được sử dụng trong các protein liên kết kháng nguyên khác nhau theo sáng chế, và do đó, ở các định dạng khác nhau như được bộc lộ ở đây. Những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ hiểu rõ hơn rằng các đặc tính liên kết của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, được chứng minh trong ngữ cảnh của một định dạng liên kết kháng nguyên, tốt hơn là ít nhất được bảo toàn khi định dạng của protein liên kết kháng nguyên được thay đổi (tức là, ít nhất các trình tự axit amin CDR của miền biến đổi thứ nhất và thứ hai, tốt hơn là axit amin của miền biến đổi thứ nhất và thứ hai là giống hệt nhau).

Như đã đề cập ở trên, chức năng liên kết của các CDR trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được đề xuất trong khuôn khổ của kháng thể. Ví dụ, các trình tự axit amin CDR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, có thể bao gồm các phần còn lại bổ sung của khung đầu cuối 3, 2 hoặc 1 N và/hoặc C, có thể được ghép trực tiếp vào

trình tự chuỗi nặng/nhẹ biến đổi kháng thể. Cụ thể hơn, các miền CDRa1, CDRa2 và CDRa3 được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được ghép trong trình tự axit amin chuỗi nặng biến đổi và CDRb1, CDRb2 và CDRb3 được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được ghép theo trình tự axit amin chuỗi nhẹ biến đổi, hoặc ngược lại.

Như cũng sẽ được hiểu, theo một số phương án, trong kháng thể, vùng chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể có thể được thay thế bằng miền biến đổi thứ nhất như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế và miền chuỗi nặng biến đổi có thể được thay thế bằng miền biến đổi thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, hoặc ngược lại.

Tuy nhiên, theo một phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên còn bao gồm các vùng khung alpha và vùng khung beta.

Theo một phương án, miền biến đổi thứ nhất này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, trong đó

- FR1-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT' SEQ ID NO: 83 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 83,

- FR2-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LYWYKQEPGAGLQLLTY' SEQ ID NO: 84 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 84,

- FR3-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF' SEQ ID NO: 85 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 85,

- FR4-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 86 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 86, và

miền biến đổi thứ hai này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, trong đó

- FR1-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI' SEQ ID NO: 87 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 87,

- FR2-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LFWYRQTMMRGLELLIY' SEQ ID NO: 88 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 88

- FR3-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF' SEQ ID NO: 89 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 89, hoặc

- FR4-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GEGSRLTVL' SEQ ID NO: 90 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 90.

Theo một phương án, miền biến đổi thứ nhất này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, trong đó

- FR1-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT' SEQ ID NO: 83 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 83;

- FR2-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LYWYKQEPGAGLQLLTY' SEQ ID NO: 84 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 84,

- FR3-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF' SEQ ID NO: 85 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 85;

- FR4-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 86 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 86;

và

miền biến đổi thứ hai này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, và trong đó

- FR1-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI' SEQ ID NO: 87 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 87;

- FR2-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LFWYRQTMMRGLELLIY' SEQ ID NO: 88 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 88;

- FR3-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF' SEQ ID NO: 89 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 89; hoặc

- FR4-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GEGSRLTVL' SEQ ID NO: 90 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 90% với SEQ ID NO: 90.

Theo một phương án, miền biến đổi thứ nhất này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, trong đó

- FR1-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT' SEQ ID NO: 83 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 83;

- FR2-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LYWYKQEPGAGLQLLTY' SEQ ID NO: 84 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 84,

- FR3-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF' SEQ ID NO: 85 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 85;

- FR4-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 86 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 86;

và

miền biến đổi thứ hai này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, trong đó

- FR1-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI' SEQ ID NO: 87 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 87;

- FR2-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LFWYRQTMMRGLELLIY' SEQ ID NO: 88 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 88;

- FR3-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF' SEQ ID NO: 89 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 89; hoặc

- FR4-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GEGSRLTVL' SEQ ID NO: 90 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO: 90.

Do đó, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tốt hơn nữa là còn bao gồm miền hằng định, ví dụ, miền hằng định alpha và/hoặc miền hằng định beta, hoặc miền hằng định gamma và/hoặc miền hằng định delta như được mô tả ở trên. Tốt hơn là các miền hằng định alpha và beta và/hoặc các miền hằng định gamma và delta bao gồm các đột biến khác không có trong các TCR nguyên bản để tăng cường sự bắt cặp của hai chuỗi chuyển gen, tức là chuỗi alpha và beta. Ví dụ, vị trí 48 của TRAC và ở vị trí 57 của TRBC1 hoặc TRBC2 có thể được thay thế bằng các gốc cystein. Các ví dụ khác cho các sửa đổi như vậy được mô tả ở trên. Các ví dụ về miền hằng định alpha và miền hằng định beta có trong protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là SEQ ID NO: 8 (miền hằng định alpha của TCR R7P1D5) và SEQ ID NO: 15 (miền hằng định beta của TCR R7P1D5).

Theo một phương án, các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm phân tử TCR như được xác định ở trên, ví dụ, phân tử bao gồm ít nhất một miền biến đổi alpha và một miền biến đổi beta (alpha/beta TCR) hoặc phân tử bao gồm ít nhất một miền biến đổi gamma hoặc miền biến đổi delta. Nói cách khác, những TCR này là các phân tử dị phân tử, cụ thể là các dị phân tử alpha/beta và gamma/delta.

Để sử dụng trong liệu pháp tế bào nuôi (adoptive cell therapy - ACT), TCR dị phân tử alpha/beta hoặc gamma/delta có thể được truyền dưới dạng chuỗi dài đầy đủ có cả miền tế bào chất và miền xuyên màng vào tế bào T của bệnh nhân. Các miền hằng định có thể bao gồm các đột biến phù hợp, tức là, liên kết disulfua, để cải thiện

sự bắt cặp của các chuỗi alpha/beta hoặc gamma/delta mong muốn, chuyển gen và giảm sự bắt cặp của alpha/beta hoặc gamma/delta nội sinh với các chuỗi chuyển gen tương ứng. Do đó, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tốt hơn là còn bao gồm miền hằng định, ví dụ, miền hằng định alpha và/hoặc miền hằng định beta như được mô tả ở trên. Tốt hơn là các miền hằng định alpha và beta bao gồm các đột biến khác không có trong các TCR nguyên bản để tăng cường sự bắt cặp của hai chuỗi, tức là, chuỗi alpha và beta, hoặc chuỗi gamma và delta, tương ứng. Ví dụ, vị trí 48 của TRAC và ở vị trí 57 của TRBC1 hoặc TRBC2 được thay thế bằng các gốc cystein. Các ví dụ về miền hằng định alpha và miền hằng định beta có trong protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là SEQ ID NO: 8 (miền hằng định alpha của TCR R7P1D5) và SEQ ID NO: 15 (miền hằng định beta của TCR R7P1D5)

Trong phương án được ưu tiên, TCR bao gồm chuỗi alpha bao gồm miền biến đổi alpha bao gồm CDR1alpha, CDR2alpha và CDR3alpha và còn bao gồm miền hằng định alpha; và chuỗi beta bao gồm miền biến đổi beta bao gồm CDR1beta, CDR2beta, CDR3beta và còn bao gồm miền hằng định beta. Trong phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi alpha bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, tốt hơn là các trình tự axit amin SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, tốt hơn nữa là các trình tự axit amin SEQ ID NO: 35 và 38, ví dụ, SEQ ID NO: 35; và miền biến đổi beta bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14.

Trong phương án được ưu tiên, TCR bao gồm chuỗi alpha bao gồm miền biến đổi alpha bao gồm CDR1alpha, CDR2alpha và CDR3alpha và còn bao gồm miền hằng định alpha; và chuỗi beta bao gồm miền biến đổi beta bao gồm CDR1beta, CDR2beta, CDR3beta và còn bao gồm miền hằng định beta. Trong phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi alpha bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5,

CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 35, và miền biến đổi beta bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14.

Trong phương án được ưu tiên khác, TCR bao gồm chuỗi alpha bao gồm miền biến đổi alpha bao gồm CDR1alpha, CDR2alpha và CDR3alpha và còn bao gồm miền hằng định alpha; và chuỗi beta bao gồm miền biến đổi beta bao gồm CDR1beta, CDR2beta, CDR3beta và còn bao gồm miền hằng định beta. Trong phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi alpha bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRa1, CDRa2 và CDRa3, trong đó CDRa1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, CDRa2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, CDRa3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 38, và miền biến đổi beta bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR) CDRb1, CDRb2 và CDRb3, trong đó CDRb1 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, CDRb2 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14.

Trong phương án được ưu tiên khác, các miền alpha và beta biến đổi của TCR còn bao gồm các vùng khung alpha và các vùng khung beta, tương ứng.

Theo một phương án, miền biến đổi alpha thứ nhất này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, trong đó FR1-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT' SEQ ID NO: 83, FR2-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LYWYKQEPGAGLQLLTY' SEQ ID NO: 84, FR3-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF' SEQ ID NO: 85, FR4-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 86, và

miền biến đổi beta thứ hai này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, trong đó FR1-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của

'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI' SEQ ID NO: 87, FR2-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LFWYRQTMMRGLELLIY' SEQ ID NO: 88, FR3-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF' SEQ ID NO: 89, FR4-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GEGSRLTVL' SEQ ID NO: 90.

Theo phương án được ưu tiên khác, cácTCR bao gồm miền biến đổi bất kỳ trong số các miền biến đổi được xác định ở trên, còn bao gồm miền hằng định alpha bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 8 hoặc trình tự giống ít nhất 85%, 90% hoặc 95% với SEQ ID NO: 8; và miền hằng định beta bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 15 hoặc trình tự giống ít nhất 85%, 90% hoặc 95% với SEQ ID NO: 15.

Các biến thể của protein liên kết kháng nguyên như được mô tả ở đây được dự tính và đề cập rõ ràng đến việc sử dụng từ ngữ "giống ít nhất 85% với trình tự tham chiếu" như đã định nghĩa ở trên trong định nghĩa phần. Ví dụ, trình tự FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a và FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b có thể khác với các trình tự tham chiếu SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO: 86 SEQ ID NO:87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 và SEQ ID NO: 90, như thích hợp, bởi ít nhất một (các) thay thế axit amin, đặc biệt bằng ít nhất một (các) thay thế axit amin bảo toàn và/hoặc (các) thay thế bằng các phần còn lại kiểu mẫu. Cụ thể, các trình tự FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a và FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b của miền biến đổi thứ nhất và thứ hai có thể khác với các trình tự tham chiếu SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO: 86,SEQ ID NO:87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 và SEQ ID NO: 90 chỉ bởi (các) thay thế axit amin bảo toàn.

Các sửa đổi và thay đổi có thể được thực hiện trong trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, và trong các trình tự DNA tương ứng, và vẫn dẫn đến protein hoặc polypeptit liên kết kháng nguyên chức năng với các đặc tính mong muốn. Các sửa đổi có thể được thực hiện trong miền biến đổi thứ nhất hoặc thứ hai, cụ thể là trong các vùng khuôn khổ hoặc trong từng CDR hoặc trong tất cả các CDR có trong miền biến đổi thứ nhất và/hoặc thứ hai.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng bằng cách sử dụng vùng khung của các thay thế axit amin đặc hiệu TCR R7P1D5 mẹ trong vùng khung của các

protein liên kết kháng nguyên có tác dụng có lợi. Cụ thể, các thay thế axit amin S19A hoặc S19V, tốt hơn là S19V, là rất quan trọng để biểu hiện cấu trúc TCR chuỗi đơn hòa tan, cụ thể là ngoài trình tự axit amin CDRa2 bao gồm ở vị trí axit amin thứ hai axit amin Y, tức là, axit amin 57 theo IMGT là Y (57Y) trong CDRa2. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các thay thế axit amin A48K và L50P trong FR2-a, M46P, M47G trong FR2-b hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp làm tăng năng suất biểu hiện của các protein liên kết kháng nguyên hòa tan theo sáng chế. Các tác giả sáng chế cũng chỉ ra rằng I54F trong FR2-b làm tăng năng suất biểu hiện của các protein liên kết kháng nguyên hòa tan và, cụ thể là ngoài trình tự axit amin CDRb3 bao gồm D ở vị trí 109 theo IMGT, làm tăng tính ổn định của các protein liên kết kháng nguyên hòa tan. Ngoài ra, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng sự thay thế I54F trong FR2-b đã cải thiện đáng kể tính đặc hiệu của các protein liên kết kháng nguyên hòa tan.

Theo đó, theo một phương án, các vùng khung của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm ít nhất một thay thế axit amin, tốt hơn là một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc 10, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5, từ 2 đến 5, ví dụ như 3 hoặc 4 thay thế axit amin được lựa chọn từ nhóm thay thế axit amin bao gồm:

- thay thế axit amin ở vị trí 19 trong FR1-a, trong đó thay thế axit amin này tốt hơn là S19A, S19V, tốt hơn nữa là S19V

- thay thế axit amin ở vị trí 48 và/hoặc 50 trong FR2-a, trong đó thay thế axit amin ở vị trí 48 tốt hơn là A48K và thay thế axit amin nói trên ở vị trí 50 tốt hơn là L50P,

- thay thế axit amin ở vị trí 46, 47 và/hoặc 54 trong FR2-b, trong đó thay thế axit amin này ở vị trí 46, 47 và 54, tốt hơn là M46P, M47G và I54F, tương ứng, trong đó tốt hơn là axit amin nói trên ở vị trí 54 là I54F khi trình tự axit amin CDRb3 như được xác định ở trên bao gồm ở vị trí 109 là axit amin 109D,

- thay thế axit amin ở vị trí 66 trong FR3-b, trong đó thay thế axit amin này ở vị trí 66 tốt hơn là I66C và trong đó tốt hơn là axit amin nói trên ở vị trí 66 là 66C khi trình tự axit amin CDRb2 như được xác định ở trên bao gồm ở vị trí 57 là axit amin 57C,

và trong đó các vị trí của các thay thế được cho theo danh pháp IMGT, và trong đó thay thế axit amin nói trên tùy chọn được đưa ra so với trình tự axit amin của trình tự axit amin khung tương ứng của TCR R7P1D5 mẹ.

Theo phương án được ưu tiên, các vùng khung của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các thay thế axit amin S19V, A48K, và I54F hoặc S19V, A48K, tốt hơn là S19V, A48K và I54F, trong đó các vị trí của các thay thế được đưa ra theo danh pháp IMGT. Theo một phương án, sự kết hợp thay thế axit amin này được kết hợp thêm một cách có lợi với CDRb3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'CASRAX$_1$TGELFF' SEQ ID NO: 82, trong đó X_1 là D, hoặc, theo cách đánh số IMGT, trong đó axit amin CDRb3 bao gồm axit amin 109D ở vị trí 109. Theo phương án được ưu tiên khác, các vùng khung của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế còn bao gồm thay thế axit amin I66C, trong đó tốt hơn là FR3-b bao gồm thay thế axit amin I66C, khi trình tự axit amin CDRb2 như được xác định ở trên bao gồm ở vị trí 57 axit amin 57C.

Theo đó, theo một phương án, miền biến đổi thứ nhất này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là tất cả các vùng khung, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a, trong đó

- FR1-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT' SEQ ID NO: 91 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 91, trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 91 bao gồm axit amin 19V (được gạch chân trong SEQ ID NO: 91),

- FR2-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của LYWYKQEPGKGLQLLTY' SEQ ID NO: 92 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 92, trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 92 bao gồm axit amin 48K (được gạch chân trong SEQ ID NO: 92) và tùy chọn, thay thế axit amin tại vị trí 50, tốt hơn là L50P,

- FR3-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF' SEQ ID NO: 85 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 85,

- FR4-a bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 86 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 86, và

miền biến đổi thứ hai này còn bao gồm một hoặc nhiều vùng khung, tốt hơn là các vùng khung, được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b, trong đó

- FR1-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI' SEQ ID NO: 87 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 87,

- FR2-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'LFWYRQTMMRGLELLFY' SEQ ID NO: 93 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 93, trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 93 bao gồm axit amin 54F, và tùy chọn, thay thế axit amin tại vị trí 46 và/hoặc 47, trong đó thay thế axit amin này tại vị trí 46 và/hoặc 47 tốt hơn là M46P và/hoặc M47G, tương ứng,

- FR3-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF' SEQ ID NO: 89 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 89, hoặc của trình tự axit amin của 'CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF' SEQ ID NO: 94 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 94, trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 94 bao gồm axit amin 66C, và trong đó FR3-b tốt hơn là bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 94 bao gồm axit amin 66C, trong khi trình tự axit amin CDRb2 như được xác định ở trên bao gồm tại vị trí 57 axit amin 57C,

- FR4-b bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin của 'GEGSRLTVL' SEQ ID NO: 90 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 90.

Các biến thể của các protein liên kết kháng nguyên như được mô tả ở đây được dự tính và đề cập rõ ràng đến việc sử dụng từ ngữ "giống ít nhất 85% với trình tự tham chiếu" như đã định nghĩa ở trên trong phần định nghĩa. Ví dụ, trình tự FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a và FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b có thể khác với các trình tự tham chiếu SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO:93 và SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO:94, SEQ ID NO: 90, như thích hợp, bởi ít nhất một (các) thay thế axit amin, đặc biệt bằng ít nhất một (các) thay thế axit amin bảo toàn và/hoặc (các) thay thế bằng các phần còn lại kiểu mẫu. Cụ

thể, các trình tự FR1-a, FR2-a, FR3-a và FR4-a và FR1-b, FR2-b, FR3-b và FR4-b của miền biến đổi thứ nhất và thứ hai có thể khác với các trình tự tham chiếu SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO:93 và SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO:94, SEQ ID NO: 90 chỉ bởi (các) thay thế axit amin bảo toàn.

Các sửa đổi và thay đổi có thể được thực hiện trong trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, và trong các trình tự DNA tương ứng mã hóa chúng, và vẫn dẫn đến protein hoặc polypeptit liên kết kháng nguyên chức năng với các đặc tính mong muốn.

Theo đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm

(i) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm miền biến đổi thứ nhất bao gồm trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 118, 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFTSESKIIFGSGTRLSIRP' 'SEQ ID NO: 119, 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFNSESKIIFGSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 120, 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFSSASKIIFGSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 121, 'EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEATSESKIIFGSGTRLSIRP' SEQ ID NO: 122, tốt hơn là SEQ ID NO: 118 và SEQ ID NO: 121, tốt hơn nữa là SEQ ID NO: 118, hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 118 đến 122 và trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm

SEQ ID NO: 118 đến 122 tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin của CDRa1 của SEQ ID NO: 5, CDRa2 của SEQ ID NO: 6 và CDRa3 của SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, trong trường hợp của SEQ ID NO: 118 đến 122, tương ứng, và

(ii) chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm miền biến đổi thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 85% với SEQ ID NO: 11, trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 11 bao gồm tốt hơn là trình tự axit amin của CDRb1, CDRb2 và CDRb3 của SEQ ID NO: 12, 13, 14, lần lượt, hoặc

(iii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm miền biến đổi thứ nhất bao gồm trình tự axit amin 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQD QKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSI RP' 'SEQ ID NO: 151 hoặc 'EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQEPGKGLQLLTYIYSSQD QKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSI RP' SEQ ID NO: 152, tốt hơn, hoặc trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 151 hoặc 152 và trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 151 tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin của CDRa1 của SEQ ID NO: 5, CDRa2 của SEQ ID NO: 56 và CDRa3 của SEQ ID NO: 35, và trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 152 tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin của CDRa1 của SEQ ID NO: 55, CDRa2 của SEQ ID NO: 56 và CDRa3 của SEQ ID NO: 35 và tốt hơn là còn bao gồm các axit amin 19V và/hoặc 48K, và

(ii) chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm miền biến đổi thứ hai bao gồm trình tự axit amin DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYG TPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEG SRLTVL' SEQ ID NO: 149 hoặc 'DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCY GTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGE GSRLTVL' SEQ ID NO: 150, và trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85%

với trình tự axit amin SEQ ID NO: 149 tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin của CDRb1 của SEQ ID NO: 62, CDRb2 của SEQ ID NO: 65 và CDRb3 của SEQ ID NO: 14, và trong đó trình tự axit amin này giống ít nhất 85% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 150 tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin của CDRb1 của SEQ ID NO: 62, CDRb2 của SEQ ID NO: 65 và CDRb3 của SEQ ID NO: 71, và tốt hơn là còn bao gồm các axit amin 54F và/hoặc 66C.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể hoặc đoạn của nó, hoặc kháng thể nhị đặc hiệu hoặc đoạn của nó, hoặc thụ thể tế bào T (TCR) hoặc đoạn của nó, hoặc thụ thể tế bào T nhị đặc hiệu (TCR) hoặc đoạn của nó. Kháng thể và TCR và các đoạn tương ứng như được định nghĩa ở trên trong phần 'Định nghĩa'.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ người, được hiểu là được tạo ra từ vị trí kháng nguyên của người và do đó bao gồm trình tự của người, cụ thể là, TCR hoặc các trình tự kháng thể của người.

Theo một phương án, polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau, cụ thể là, thông qua liên kết cộng hóa trị.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên là protein hòa tan.

"Liên kết cộng hóa trị", "trình tự liên kết" hoặc "chất kết nối polypeptit" được định nghĩa ở trên trong định nghĩa phần tại "chất kết nối".

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều chất sau:

(i) một hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên khác;

(ii) vùng xuyên màng, tùy chọn bao gồm vùng tín hiệu tế bào chất;

(iii) chất chẩn đoán;

(iv) chất trị liệu; hoặc

(v) phần phân tử sửa đổi PK.

Như được biết đối với những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, vị trí liên kết kháng nguyên, ví dụ, trong ngữ cảnh của kháng thể, thường được hình thành bởi 6 CDR liên kết với kháng nguyên.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, một hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên khác như được đề cập trong (i) ở trên tốt hơn là được lựa chọn từ vị trí liên kết mà liên kết với kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa các

kháng nguyên CD3 (ví dụ như các chuỗi CD3γ, CD3δ, và CD3ε), CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, FcεRI, TCRα/β và TCRγ/δ, HLA-DR hoặc với kháng nguyên của tế bào tác động, tốt hơn là CD3, TCRα/β hoặc CD28, tốt hơn nữa là CD3 và TCRα/β.

"CD3" và "CD28" được định nghĩa ở trên trong phần các định nghĩa.

Theo một số phương án, một trong số một hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên khác được đề cập trong (i) có thể liên kết với phân tử thụ thể đặc hiệu tế bào T và/hoặc phân tử thụ thể đặc hiệu tế bào tiêu diệt tự nhiên (tế bào NK). Theo phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên tạo thành phức hợp với đồng thụ thể tế bào T CD3.

Theo phương án được ưu tiên, một trong số một hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên khác như được đề cập trong (i) có thể liên kết TCRα/β.

Theo một số phương án, thụ thể đặc hiệu của tế bào T là đồng thụ thể của tế bào T CD3.

Theo một số phương án, thụ thể đặc hiệu của tế bào T là CD28, CD134, 4-1 BB, CD5 hoặc CD95.

"CD134", "4-1 BB", "CD5", "CD95" và "Phân tử thụ thể đặc hiệu của tế bào NK" được định nghĩa ở trên trong phần định nghĩa. "Vùng xuyên màng", "vùng tín hiệu tế bào chất", "chất chẩn đoán", "chất trị liệu" và "phần phân tử thay đổi PK" được định nghĩa ở trên trong phần định nghĩa.

Theo một số phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được gắn cộng hóa trị, trực tiếp hoặc thông qua chất kết nối có thể phân cắt hoặc không phân cắt được, với ít nhất một chất ức chế tăng trưởng. Protein liên kết kháng nguyên mà ít nhất một chất ức chế tăng trưởng được gắn vào đó cũng có thể được gọi là chất liên hợp.

Việc điều chế các chất liên hợp này, ví dụ, chất liên hợp miễn dịch, được mô tả trong đơn đăng ký WO2004/091668 hoặc Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209-223 (2005) và Kirin et al., Inorg Chem. 44(15): 5405-5415 (2005), và có thể được

chuyển giao bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này để điều chế các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế mà ít nhất một chất ức chế tăng trưởng được gắn vào đó.

"Chất kết nối" trong ngữ cảnh gắn ít nhất một chất ức chế tăng trưởng, có nghĩa là phần phân tử hóa học bao gồm liên kết cộng hóa trị hoặc chuỗi nguyên tử liên kết cộng hóa trị với polypeptit vào phần phân tử thuốc.

Các chất liên hợp có thể được điều chế bằng các phương pháp in vitro. Để liên kết thuốc hoặc tiền chất với kháng thể, nhóm liên kết được sử dụng. Các nhóm liên kết thích hợp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và bao gồm các nhóm disulfua, các nhóm thiote, các nhóm không bền axit, các nhóm bền quang, các nhóm không bền peptidaza và các nhóm không bền esteraza. Việc liên hợp protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế với các chất gây độc tế bào hoặc các chất ức chế tăng trưởng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều chất ghép protein chức năng kép khác nhau bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi N-succinimidyl pyridyldithiobutyrat (SPDB), axit butanoic 4-[(5-nitro-2-pyridinyl)dithio]-2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl este (nitro-SPDB), axit 4-(Pyridin-2-yldisulfanyl)-2-sulfo-butyric (sulfo-SPDB), N-succinimidyl (2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl (N-maleimidomethyl) xyclohexan-1-cacboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất chức năng kép của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), este hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), các aldehyt (ví dụ như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (ví dụ như bis (p-azidobenzoyl)-hexanediamine), các dẫn xuất bis-diazonium (ví dụ như bis- (p-diazoniumbenzoyl) -ethylenediamine), diisocyanat (ví dụ như toluen 2,6-diisocyanat), và các hợp chất flo hoạt tính bis (ví dụ như 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch ricin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al. (1987). Axit 1-isothiocyanatobenzyl metyldietylen triaminepentaacetic được được dán nhãn carbon (MX-DTPA) là chất tạo chelat mẫu cho sự liên hợp của radionucleotit với kháng thể (WO 94/11026).

Chất kết nối có thể là "chất kết nối có thể phân cắt" tạo điều kiện giải phóng chất gây độc tế bào hoặc chất ức chế tăng trưởng trong tế bào. Ví dụ, có thể sử dụng chất kết nối không bền axit, chất kết nối nhạy cảm với peptidaza, chất kết nối không bền esteraza, chất kết nối quang bền hoặc chất kết nối chứa disulfua (Xem, ví dụ, Bằng

sáng chế Hoa Kỳ số 5,208,020). Chất kết nối cũng có thể là "chất kết nối không thể phân cắt" (ví dụ, chất kết nối SMCC) mà có thể dẫn đến khả năng chịu đựng tốt hơn trong một số trường hợp.

Ngoài ra, protein dung hợp bao gồm kháng thể theo sáng chế và polypeptit ức chế tăng trưởng hoặc gây độc tế bào có thể được tạo ra, bằng kỹ thuật tái tổ hợp hoặc tổng hợp peptit. Chiều dài của DNA có thể bao gồm các vùng tương ứng mã hóa hai phần của chất liên hợp nằm kề nhau hoặc được ngăn cách bởi vùng mã hóa peptit chất kết nối mà không phá hủy các đặc tính mong muốn của chất liên hợp.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong Liệu pháp tiền chất phụ thuộc vào enzym bằng cách liên hợp polypeptit thành enzym hoạt hóa tiền chất để chuyển đổi tiền chất (ví dụ, chất hóa trị liệu peptidyl, xem WO 81/01145) thành thuốc chống ung thư hoạt hóa (Ví dụ, xem WO 88/07378 và Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4.975.278).

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều chất sau: enzym, cytokin (ví dụ như IL-2, IL-7 hoặc IL-15 của người), chất mang nano, hoặc axit nucleic.

Theo một phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên là nhị đặc hiệu. Protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu ở đây còn được đề cập đến là “phân tử nhị đặc hiệu”.

Nhiều định dạng nhị đặc hiệu khác nhau được mô tả trong giải pháp kỹ thuật và được mô tả ở trên trong phần “Định nghĩa” tại “định dạng”. Các kỹ thuật tạo ra protein có các định dạng khác nhau cũng được bộc lộ trong giải pháp kỹ thuật được trích dẫn trong phần tương ứng và do đó, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này có thể dễ dàng sử dụng các CDR hoặc các miền biến đổi như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế ở các định dạng được bộc lộ ở đây. Việc sản xuất các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như scTCR hoặc các protein liên kết nhị đặc hiệu hòa tan, ví dụ như TCER™ cũng được mô tả ở đây trong phần Ví dụ. Những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, các miền biến đổi chuỗi nhẹ và nặng có thể theo định hướng song song và miền biến đổi alpha và beta có thể theo định hướng song song như trường hợp của định dạng DVD, hoặc các miền biến đổi chuỗi nhẹ và nặng

có thể theo định hướng chéo và miền biến đổi alpha và beta có thể theo định hướng chéo như trường hợp, ví dụ, của định dạng CODV.

Theo đó, sáng chế còn đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên (A và B), trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất có cấu trúc được biểu thị bằng công thức:

$$V_3 –L_1\text{-}V_4\text{-}L_2–C_L \qquad [I]$$

trong đó V_3 là miền biến đổi thứ ba; V_4 là miền biến đổi thứ tư; L_1 và L_2 là các chất kết nối; L_2 có thể có mặt hoặc không có mặt; C_L là miền hằng định chuỗi nhẹ hoặc phần của nó và có mặt hoặc không có mặt;

và trong đó chuỗi polypeptit thứ hai có cấu trúc được biểu thị bằng công thức:

$$V_5\text{-}L_3\text{-}V_6\text{-}L_4–C_{H1} \qquad [II]$$

trong đó V_5 là miền biến đổi thứ năm; V_6 là miền biến đổi thứ sáu; L_3 và L_4 là các chất kết nối; L_4 có thể có mặt hoặc không có mặt; C_{H1} là miền hằng định chuỗi nặng 1 hoặc phần của nó và có mặt hoặc không có mặt; và trong đó

V_3 hoặc V_4 là miền biến đổi thứ nhất như được xác định ở trên và V_5 hoặc V_6 là miền biến đổi thứ hai như được xác định ở trên, hoặc

V_5 hoặc V_6 là miền biến đổi thứ nhất như được xác định ở trên trong ngữ cảnh của sáng chế và V_3 hoặc V_4 là miền biến đổi thứ hai như được xác định ở trên, và trong đó

V_3 là miền biến đổi thứ nhất và V_5 là miền biến đổi thứ hai như được xác định ở trên và V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_6 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_6 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc,

V_3 là miền biến đổi thứ hai và V_5 là miền biến đổi thứ nhất như được xác định ở trên và V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_6 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_6 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc,

V_3 là miền biến đổi thứ nhất và V_6 là miền biến đổi thứ hai như được xác định ở trên và V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_5 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_5 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc,

V_3 là miền biến đổi thứ hai và V_6 là miền biến đổi thứ nhất như được xác định ở trên, và V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_5 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_5 là miền biến đổi chuỗi nhẹ,

V_4 là miền biến đổi thứ nhất và V_5 là miền biến đổi thứ hai như được xác định ở trên và V_3 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_6 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc V_3 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_6 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc,

V_4 là miền biến đổi thứ hai và V_5 là miền biến đổi thứ nhất như được xác định ở trên, và V_3 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_6 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc V_3 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_6 là miền biến đổi chuỗi nhẹ,

và trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng cùn hình thành một vị trí liên kết kháng nguyên B, và trong đó miền biến đổi thứ nhất và thứ hai như được xác định ở trên tạo thành một vị trí liên kết kháng nguyên A. Các chất kết nối L_1, L_2, L_3, L_4 là được xác định ở trên trong phần 'Định nghĩa.' Tuy nhiên, theo một số phương án, một số độ dài chất kết nối có thể thích hợp hơn cho định dạng cụ thể. Tuy nhiên, kiến thức liên quan đến độ dài trình tự liên kết và các trình tự axit amin của chúng thuộc về kiến thức chung của lĩnh vực này và các chất kết nối cũng như trình tự liên kết và axit amin cho các định dạng khác nhau là phần của tình trạng kỹ thuật và được bộc lộ ở các bộc lộ trích dẫn trên đây.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ hiểu rằng vị trí liên kết kháng nguyên A, hình thành miền biến đổi thứ nhất và thứ hai như được xác định ở trên liên kết cụ thể với phức hợp peptit MAGE-A/MHC như được mô tả ở đây trong ngữ cảnh của sáng chế.

Trong phương án được ưu tiên, V_3 là miền biến đổi thứ nhất và V_6 là miền biến đổi thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, và V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_5 là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc

V_3 là miền biến đổi thứ nhất và V_6 là miền biến đổi thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_5 là miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, polypeptit có công thức [I] còn bao gồm tại đầu cuối C polypeptit có công thức [I] chất kết nối (L_5) và miền F_c hoặc phần của nó và/hoặc trong đó polypeptit có công thức [II] còn bao gồm ở đầu cuối C của polypeptit có công thức [II] chất kết nối (L_6) và miền F_c hoặc phần của nó.

Miền F_c như được xác định ở trên trong phần "định nghĩa".

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên (A và B),

trong đó một chuỗi polypeptit có cấu trúc được biểu thị bằng công thức [III]:

$$V_3\text{-}L_1\text{-}V_4\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{C1} \qquad [III]$$

và một chuỗi polypeptit có cấu trúc được biểu thị bằng công thức [IV]:

$$V_5\text{-}L_3\text{-}V_6\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}L_6\text{-}F_{C2} \qquad [IV]$$

trong đó V_3, L_1, V_4, L_2, C_L, V_5, L_3, V_6, L_4, C_{H1}, là như được xác định ở trên, và trong đó L_5 và L_6 là các chất kết nối có mặt hoặc vắng mặt và trong đó F_{C1}, và F_{C2} là các miền F_c và trong đó F_{C1} và F_{C2} giống nhau hoặc khác nhau, tốt hơn là khác nhau. Miền F_c như được xác định ở trên trong phần "định nghĩa".

Theo một phương án, F_{C1} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113 (lỗ) và F_{C2} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112 (núm), hoặc ngược lại,

tốt hơn là, F_{C1} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113, khi V_4 hoặc V_3 là miền biến đổi chuỗi nặng và, theo đó, F_{C2} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112, khi V_5 hoặc V_6 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc

F_{C1} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112, khi V_4 hoặc V_3 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và, theo đó, F_{C2} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113, khi V_5 hoặc V_6 là miền biến đổi chuỗi nặng.

Theo một phương án, miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) cùng nhau tạo thành một vị trí liên kết B liên kết với kháng nguyên được lựa chọn từ nhóm chỉ chứa CD3 (ví dụ như các chuỗi CD3γ, CD3δ, và CD3ε), CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, F_cεRI, TCRα/β và TCRγ/δ, HLA-DR và/hoặc liên kết với tế bào tác động.

Theo phương án khác, miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) cùng nhau tạo thành một vị trí liên kết liên kết với phân tử thụ thể đặc hiệu tế bào T và/hoặc phân tử thụ thể đặc hiệu tế bào tiêu diệt tự nhiên (tế bào NK), trong đó phân

tử thụ thể đặc hiệu tế bào T và phân tử thụ thể đặc hiệu tế bào tiêu diệt tự nhiên (tế bào NK) được định nghĩa ở trên trong phần 'Định nghĩa'.

Theo một phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 154 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 156 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 157 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 158 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 159 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 160 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 162 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 164.

Tốt hơn là, miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 154 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 156 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 159 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 160 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 162 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 153 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 164, tốt hơn nữa là, miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 159 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 160

Như có thể thấy từ các ví dụ, tác giả sáng chế đã chứng minh như bằng chứng về nguyên tắc việc sử dụng các CDR như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, cụ

thể hơn là các miền biến đổi như được xác định ở trên, trong định dạng TCER™ (Ví dụ).

Theo đó, theo một phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó một chuỗi polypeptit có cấu trúc được biểu thị bằng công thức [III]:

$$V_3\text{-}L_1\text{-}V_4\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{C1} \qquad [III]$$

và một chuỗi polypeptit có cấu trúc được biểu thị bằng công thức [IV]:

$$V_5\text{-}L_3\text{-}V_6\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}L_6\text{-}F_{C2} \qquad [IV]$$

trong đó L_2, C_L, L_5 và L_4, C_{H1}, L_6 không có mặt, và

trong đó V_3, L_1, V_4, V_5, L_3, V_6 là như được xác định ở trên,

tốt hơn là, V_3 là miền biến đổi thứ nhất và V_6 là miền biến đổi thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, và V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và V_5 là miền biến đổi chuỗi nặng, hoặc tốt hơn là, V_3 là miền biến đổi thứ nhất và V_6 là miền biến đổi thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế, và V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và V_5 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

tốt hơn là, L_1 và L_3 bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'GGGSGGGG' có (SEQ ID NO:96), và

tốt hơn là, F_{C1} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113 và F_{C2} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112, hoặc ngược lại,

tốt hơn là, F_{C1} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113, khi V_4 là miền biến đổi chuỗi nặng và, theo đó, F_{C2} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112, khi V_5 là miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc

tốt hơn là, F_{C1} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 112, khi V_4 là miền biến đổi chuỗi nhẹ và, theo đó, F_{C2} bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 113, khi V_5 là miền biến đổi chuỗi nặng, và

miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng cùng nhau hình thành một vị trí liên kết kháng nguyên, tốt hơn là vị trí liên kết với kháng nguyên như được xác định ở trên, tốt hơn là, CD3, TCRα/β hoặc CD28, tốt hơn nữa là CD3 hoặc TCRα/β,

và trong đó miền biến đổi thứ nhất và thứ hai tạo thành một vị trí liên kết kháng nguyên liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế.

Protein liên kết kháng nguyên theo phương án này có thể được gọi là TCR nhị đặc hiệu, hoặc là diabody TCR/mAb nhị đặc hiệu chứa F_c. Protein liên kết kháng nguyên của phương án này cũng có thể được đề cập đến như là là TCER™.

"TCER™" là các thụ thể tế bào T (TCR) nhị đặc hiệu là các protein liên kết kháng nguyên hòa tan bao gồm hai miền liên kết kháng nguyên, miền biến đổi thứ nhất và thứ hai như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế và miền liên kết kháng nguyên khác được hình thành bởi miền biến đổi chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể, còn được đề cập đến như là là trình tuyển chọn, ví dụ như các miền biến đổi nặng và nhẹ được hướng chống lại CD3 hoặc được hướng chống lại TCRα/β.

Theo một phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCER™ bao gồm

- một polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{C1} [III] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 135):

EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT**DSSSTY**LYWYKQEPGKGLQLLTY**IYS**
SQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAEMTSESKII**FGSGT
RLSIRPGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWV
RQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSE
DTAVHYCARGSYYDYEGFVYWGQGTLVTVSS*EPKS**S**DKTHTCPPCPAP**PVAG***
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
*EQY**Q**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**C***
*TLPP**S**RDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF*
*L**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP*

trong đó L_2, C_L, L_5 không có mặt và bao gồm V_3 (miền biến đổi alpha được dẫn xuất TCR bão hòa) của trình tự SEQ ID NO: 138 (với CDRa1, CDRa2, CDRa3 của SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 59 và SEQ ID NO: 35 in đậm), L_1 (gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 96, V4 (chống lại TCRαβ VH) của trình tự SEQ ID NO: 160, và F_{C1} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 113; and

- một polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 136):

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYD
TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTK

VEIKGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI**PGHDYL**FWYRQTM
MRGLELLFY**FCYGTP**CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**C**
ASRADTGELFFGEGSRLTVL*EPKSSDKTHTCPPCPAP**P**VAGPSVFLFPPKPKDT*
*LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**Q**STYRVVSVL*
*TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPP**C**RDELTKNQ*
*VSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ*
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

trong đó L_4, C_{H1}, L_6 không có mặt và bao gồm V_5 (chống lại TCRαβ VL) của trình tự SEQ ID No: 159, L_3 (gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 96, V_6 (miền biến đổi beta được dẫn xuất TCR) của trình tự SEQ ID NO: 150 (với CDRa1, CDRa2, CDRa3 của SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71 in đậm) và F_{C2} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 112, trong đó trình tự F_{C1} và F_{C2} bao gồm thay thế axit amin cystein thành serin (S được in đậm) vì không cần chuỗi nhẹ được kết nối thông qua cystein, thay thế axit amin của vùng bản lề IgG1 để giống với bản lề IgG2 để loại bỏ tương tác thụ thể F_c-gamma (PVA được in đậm ở vị trí từ 233 đến 235 và 331S), thay thế axit amin N297Q (Q in đậm) để loại bỏ vị trí N-Glycosyl hóa trong phần F_c để loại bỏ tương tác thụ thể F_c-gamma và ngoài đột biến lỗ (Y349C, T366S, L368A và Y407V) trong trường hợp của F_{C1} và đột biến núm (S354C và T366W) trong trường hợp của F_{C2}. Theo đó, theo một phương án được ưu tiên, F_{C1} có trình tự SEQ ID NO: 113 và F_{C2} có trình tự SEQ ID NO: 112.

Theo một phương án được ưu tiên khác, protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCER™, bao gồm một polypeptit thứ nhất có công thức **V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{C1}** [III] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 136):

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYD
TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTK
VEIKGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI**PGHDY**LFWYRQTM
MRGLELLFY**FCYGTP**CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**C**
ASRADTGELFFGEGSRLTVL*EPKSSDKTHTCPPCPAP**PVA**GPSVFLFPPKPKDT*
*LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**Q**STYRVVSVL*
*TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPP**C**RDELTKNQ*

VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

trong đó L_2, C_L, L_5 không có mặt và bao gồm V_3 (chống lại TCRαβ VL) của trình tự SEQ ID NO: 159, L_1 (gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 96, V_4 (miền biến đổi beta được dẫn xuất TCR) của trình tự SEQ ID NO: 150 (với CDRb1, CDRb2, CDRb3 của trình tự SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71 in đậm) và F_{C1} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 112; and

một polypeptit thứ hai có công thức **V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{C2}** [IV] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 137):

EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT**DSSSTY**LYWYKQEPGKGLQLLTY**IYS SQDQ**KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAEMTSESKIIF**GSGT RLSIRPGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWV RQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSE DTAVHYCARGSYYDYEGFVYWGQGTLVTVSS*EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP*

trong đó L_4, C_{H1}, L_6 không có mặt và bao gồm V_5 (miền biến đổi alpha được dẫn xuất TCR bão hòa) của trình tự SEQ ID NO: 151 (với CDRa1, CDRa2, CDRa3 của SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 35 in đậm), L_3 (gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 96, V_6 (chống lại TCRαβ VH) của trình tự SEQ ID NO: 160, và F_{C2} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 113,

trong đó trình tự F_{C1} và F_{C2} bao gồm cystein để thay thế axit amin serin (S được in đậm) vì không cần chuỗi nhẹ nào được kết nối thông qua thay thế axit amin cystein của vùng bản lề IgG1 để giống với bản lề IgG2 để loại bỏ tương tác thụ thể Fc-gamma (PVA được in đậm ở vị trí 233 đến 235 và 331S), thay thế axit amin N297Q (Q in đậm) để loại bỏ vị trí N-Glycosyl hóa trong phần F_c để loại bỏ tương tác với thụ thể F_c-gamma và ngoài đột biến lỗ (Y349C, T366S, L368A và Y407V) trong trường hợp của F_{C2} và đột biến núm (S354C và T366W) trong trường hợp của F_{C1}. Theo đó, theo một

phương án được ưu tiên, F_{C1} có trình tự SEQ ID NO: 112 và F_{C2} có trình tự SEQ ID NO: 113.

Theo một phương án được ưu tiên khác, protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCER™, bao gồm một polypeptit thứ nhất có công thức **V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{C1}** [III] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 131):

EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT**DSSSTY**LYWYKQEPGKGLQLLTY**IYS SQDQ**KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAEMTSESKIIF**GSGT RLSIRPGGGSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTL PWTFGQGTKVEIK*EPKS**S**DKTHTCPPCPAP**P**V**A**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**Q**STYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP*

trong đó L_2, C_L, L_5 không có mặt và bao gồm V_3 (miền biến đổi alpha được dẫn xuất TCR bão hòa) của trình tự SEQ ID NO: 151 (với CDRa1, CDRa2, CDRa3 của SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 35 in đậm), L_1 (gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 96, V_4 (chống lại TCRαβ VL) của trình tự SEQ ID NO: 153, và F_{C1} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 112; and

và một polypeptit thứ hai có công thức **V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{C2}** [IV] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 130):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW MGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS GYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKP**IPGHDYL**FWYRQTMMRGLELLFY**FCYGTP**CDDSGMPEDRFSAKMP NASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASRADTGELF**FGEGSRLTVL*EPKSSDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP*

trong đó L_4, C_{H1}, L_6 không có mặt và bao gồm V_5 (chống lại TCRαβ VL) của trình tự SEQ ID NO: 154, L3 (được gạch dưới) của trình tự SEQ ID NO: 96, V_6 (miền biến đổi beta được dẫn xuất TCR) của trình tự SEQ ID NO: 151 (với CDRb1, CDRb2, CDRb3 của trình tự SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71 in đậm) và F_{C2} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 113,

trong đó trình tự F_{C1} và F_{C2} bao gồm cystein để thay thế axit amin serin (S được in đậm) vì không cần chuỗi nhẹ nào được kết nối thông qua thay thế axit amin cystein của vùng bản lề IgG1 để giống với bản lề IgG2 để loại bỏ tương tác thụ thể F_c-gamma (PVA được in đậm ở vị trí 233 đến 235 và 331S), thay thế axit amin N297Q (Q in đậm) để loại bỏ vị trí N-Glycosyl hóa trong phần F_c để loại bỏ tương tác thụ thể F_c-gamma và ngoài đột biến lỗ (Y349C, T366S, L368A và Y407V) trong trường hợp của F_{C2} và đột biến núm (S354C và T366W) trong trường hợp của F_{C1}. Theo đó, theo một phương án được ưu tiên, F_{C1} có trình tự SEQ ID NO: 112 và F_{C2} có trình tự SEQ ID NO: 113.

Theo một phương án được ưu tiên khác, protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCER™, bao gồm polypeptit thứ nhất có công thức **V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{C1}** [III] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 133) :

EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT**ESSSTY**LYWYKQEPGKGLQLLTY**IYS SQDQ**KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAEMTSESKIIF**GSGT RLSIRPGGGSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTL PWTFGQGTKVEIK*EPKS**S**DKTHTCPPCPAP**P**VA**G**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**Q**STYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP*

trong đó L_2, C_L, L_5 không có mặt và bao gồm V3 (miền biến đổi alpha được dẫn xuất TCR đã bão hòa) của trình tự SEQ ID NO: 152 (với CDRa1, CDRa2, CDRa3 của SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 35 in đậm), L1 (gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 96, V4 (chống lại TCRαβ VL) của trình tự SEQ ID NO: 154, và FC1 (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 112; and

một polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{C2} [IV] của trình tự axit amin (SEQ ID NO: 130):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW MGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS GYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKP**IPGHDYL**FWYRQTMMRGLELLFY**FCYGTP**CDDSGMPEDRFSAKMP NASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASRADTGELF**FGEGSRLTVL*EPKSSDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP*

trong đó L_4, C_{H1}, L_6 không có mặt và bao gồm V_5 (chống lại TCRαβ VL) của trình tự SEQ ID NO: 154, L_3 (được gạch dưới) của trình tự SEQ ID NO: 96, V_6 (miền biến đổi beta được dẫn xuất TCR) của trình tự SEQ ID NO: 151 (với CDRb1, CDRb2, CDRb3 của trình tự SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 71 in đậm) và F_{C2} (in nghiêng và gạch chân) của trình tự SEQ ID NO: 113,

trong đó trình tự F_{C1} và F_{C2} bao gồm cystein để thay thế axit amin serin (S được in đậm) vì không cần chuỗi nhẹ nào được kết nối thông qua thay thế axit amin cystein của vùng bản lề IgG1 để giống với bản lề IgG2 để loại bỏ tương tác thụ thể F_c-gamma (PVA được in đậm ở vị trí 233 đến 235 và 331S), thay thế axit amin N297Q (Q in đậm) để loại bỏ vị trí N-Glycosyl hóa trong phần F_c để loại bỏ tương tác thụ thể F_c-gamma và ngoài đột biến lỗ (Y349C, T366S, L368A và Y407V) trong trường hợp của F_{C2} và đột biến núm (S354C và T366W) trong trường hợp của F_{c1}. Theo đó, theo một phương án được ưu tiên, F_{C1} có trình tự SEQ ID NO: 112 và F_{C2} có trình tự SEQ ID NO: 113.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm

(i) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 127 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 128,

(ii) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 127 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 130,

(iii) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 131 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 130,

(iv) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 133 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 130,

(v) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 135 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 136,

(vi) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 137 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 136,

(vii) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 139 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 136,

(viii) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 131 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 142,

(ix) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 133 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 142,

(x) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 131 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 136,

(xi) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-Fc_1 [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 133 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-Fc_2 [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 136,

(xii) polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 133 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 166,

tốt hơn là (iii) tới (xi), tốt hơn nữa là (iii) và (iv).

Trong một phương án thậm chí còn được ưu tiên hơn, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên chứa polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 131 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 130; hoặc sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 133 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 130; hoặc sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 135 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 136; hoặc sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 137 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 136; hoặc sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm polypeptit thứ nhất có công thức V_3-L_1-V_4-L_2-C_L-L_5-F_{c1} [III] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 139 và polypeptit thứ hai có công thức V_5-L_3-V_6-L_4-C_{H1}-L_6-F_{c2} [IV] bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 136.

Cũng có thể mong muốn sửa đổi protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên quan đến chức năng bộ phận phản ứng, ví dụ, để tăng cường hoặc giảm độc tế bào trung gian tế bào phụ thuộc kháng nguyên (antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) và/hoặc độc tế bào phụ thuộc bổ sung (complement dependent cytotoxicity - CDC) của protein liên kết kháng nguyên. Điều này có thể đạt được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều thay thế axit amin trong vùng F_c của protein liên kết kháng nguyên, ở đây còn được gọi là các biến thể F_c trong ngữ cảnh với các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, (các) gốc cystein có thể được đưa vào vùng F_c, do đó cho phép hình thành liên kết disulfua liên chuỗi

trong vùng này. Do đó, protein liên kết với kháng nguyên dị phân tử được tạo ra có thể đã cải thiện hoặc làm giảm khả năng nội hóa và/hoặc tăng khả năng tiêu diệt tế bào qua trung gian bổ thể và/hoặc độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Caron PC. et al. 1992; và Shopes B. 1992).

Kiểu sửa đổi axit amin khác của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể hữu ích để thay đổi dạng glycosyl hóa ban đầu của protein liên kết kháng nguyên, nghĩa là bằng cách xóa một hoặc nhiều phần phân tử carbohydrat được tìm thấy trong protein liên kết kháng nguyên và/hoặc thêm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa không có trong protein liên kết kháng nguyên. Sự hiện diện của một trong hai trình tự tripeptit là asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là bất kỳ axit amin nào ngoại trừ prolin, sẽ tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Việc bổ sung hoặc xóa bỏ vị trí glycosyl hóa vào protein liên kết kháng nguyên được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả ở trên (đối với các vị trí glycosyl hóa liên kết N).

Kiểu sửa đổi khác liên quan đến việc loại bỏ các trình tự được phát hiện, in silico hoặc bằng thực nghiệm, có khả năng dẫn đến các sản phẩm thoái hóa hoặc tính dị phân tử của các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên. Ví dụ, quá trình khử amit của gốc asparagin và glutamin có thể xảy ra tùy thuộc vào các yếu tố như độ pH và độ phơi nhiễm bề mặt. Các gốc asparagin đặc biệt dễ bị khử amit, chủ yếu khi xuất hiện trong trình tự Asn-Gly, và ở mức độ thấp hơn trong các trình tự dipeptit khác như Asn-Ala. Khi vị trí khử amit như vậy, cụ thể là Asn-Gly, có mặt trong protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, do đó, có thể mong muốn loại bỏ vị trí này, thường bằng cách thay thế bảo toàn để loại bỏ một trong các phần còn lại liên quan. Các thay thế này trong trình tự để loại bỏ một hoặc nhiều phần còn lại liên quan cũng được dự kiến đề cập đến theo sáng chế.

Một loại biến đổi cộng hóa trị khác liên quan đến việc ghép các glycosit về mặt hóa học hoặc enzym với protein liên kết kháng nguyên. Các quy trình này có ưu điểm là chúng không yêu cầu sản xuất protein liên kết kháng nguyên trong tế bào chủ có khả năng glycosyl hóa để glycosyl hóa liên kết N hoặc O. Tùy thuộc vào chế độ kết hợp được sử dụng, (các) đường có thể được gắn với (a) arginin và histidin, (b) các nhóm carboxyl tự do, (c) các nhóm sulfhydryl tự do như của cystein, (d) các nhóm hydroxyl

tự do như của serin, threonin, hoặc hydroxyprolin, (e) các gốc thơm ví dụ như của phenylalanin, tyrosin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amide của glutamin. Ví dụ, các phương pháp như vậy được mô tả trong WO 87/05330.

Việc loại bỏ bất kỳ phần phân tử carbohydrat nào có trên protein liên kết kháng nguyên có thể được thực hiện về mặt hóa học hoặc enzym. Quá trình khử glycosyl bằng hóa học đòi hỏi sự tiếp xúc của protein liên kết kháng nguyên với hợp chất axit trifluoromethanesulfonic, hoặc hợp chất tương đương. Điều trị này dẫn đến sự phân cắt của hầu hết hoặc tất cả các loại đường ngoại trừ đường liên kết (N-acetylglucosamin hoặc N-acetylgalactosamin), trong khi vẫn giữ nguyên protein liên kết kháng nguyên. Quá trình khử glycosyl bằng hóa học được mô tả bởi Sojahr H. et al. (1987) và bởi Edge, AS. et al. (1981). Có thể đạt được sự phân cắt enzym của các phần phân tử carbohydrat trên các kháng thể bằng cách sử dụng nhiều loại endo-glycosidaza và exo-glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura, NR. et al. (Năm 1987).

Kiểu sửa đổi cộng hóa trị khác của protein liên kết kháng nguyên bao gồm liên kết protein liên kết kháng nguyên với một trong nhiều loại polyme không chứa protein, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol hoặc polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,640, 835; 4,496, 689; 4,301, 144; 4,670, 417; 4,791, 192 hoặc 4,179,337.

Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là TCR.

Theo một phương án cụ thể, TCR là TCR của người. Theo đó, theo một phương án, miền biến đổi thứ nhất được bao gồm trong chuỗi TCR α hoặc γ; và/hoặc trong đó miền biến đổi thứ hai được bao gồm trong chuỗi TCR β hoặc δ. Theo một phương án, TCR nêu trên là dị phân tử ngẫu nhiên alpha-beta và bao gồm trình tự miền hằng định TRAC chuỗi alpha và trình tự miền hằng định TRBC1 hoặc TRBC2 chuỗi beta.

Trình tự miền hằng định TRAC chuỗi alpha và miền hằng định TRBC1 hoặc TRBC2 chuỗi beta nằm trong phần sau, còn được đề cập đến như là trình tự miền hằng định TCR. Theo một phương án, trình tự miền hằng định TCR có thể được dẫn xuất từ bất kỳ loài thích hợp nào, ví dụ như bất kỳ động vật có vú nào, ví dụ, người, chuột, khỉ, thỏ, lừa hoặc chuột, tốt hơn là người. Theo một số phương án được ưu tiên, trình tự trong miền hằng định TCR có thể được sửa đổi một chút, ví dụ, bằng cách đưa vào các trình tự dị hợp, tốt hơn là các trình tự chuột, có thể làm tăng sự biểu hiện và độ ổn

định của TCR. Ngoài ra, các đột biến ổn định khác như đã biết từ các giải pháp theo tình trạng kỹ thuật (ví dụ, WO 2018/104407, PCT/EP2018/069151, WO 2011/044186, WO 2014/018863) có thể được đưa vào, ví dụ như việc thay thế các axit amin không thuận lợi trong các vùng biến đổi và/hoặc việc đưa vào cầu nối disulfua giữa các miền TCR C và việc loại bỏ cystein chưa được bắt cặp.

Cụ thể, các trình tự miền hằng định TCR có thể được sửa đổi bằng cách cắt ngắn hoặc thay thế để xóa liên kết disulfua nguyên bản giữa Cys4 của exon 2 của TRAC và Cys2 của exon 2 của TRBC1 hoặc TRBC2. (Các) trình tự miền hằng định chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta cũng có thể được sửa đổi bằng cách thay thế các gốc cystein cho Thr 48 của TRAC và Ser 57 của TRBC1 hoặc TRBC2, các cystein nói trên tạo thành liên kết disulfua giữa các miền hằng định alpha và beta của TCR. TRBC1 hoặc TRBC2 cũng có thể bao gồm đột biến cystein thành alanin ở vị trí 75 của miền hằng định và đột biến asparagin thành axit aspartic ở vị trí 89 của miền hằng định. Miền hằng định có thể, ngoài ra hoặc theo cách khác, chứa các đột biến, các thay thế hoặc các sự xóa khác liên quan đến trình tự TRAC và/hoặc TRBC1/2 nguyên bản. Thuật ngữ TRAC và TRBC1/2 bao gồm các biến thể đa hình tự nhiên, ví dụ, từ N đến K ở vị trí 4 của TRAC (Bragado et al In! Immunol. 1994 tháng 2; 6 (2): 223-30).

Theo một phương án, TCR là hợp thể.

"TCR hợp thể" ở đây đề cập đến TCR, trong đó chuỗi TCR bao gồm các trình tự từ nhiều loài. Tốt hơn là, TCR trong ngữ cảnh của sáng chế có thể bao gồm chuỗi α bao gồm vùng biến đổi của người của chuỗi α và, ví dụ, vùng hằng định của chuột của chuỗi TCR α của chuột.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là TCR chuỗi đơn (scTCR) hoặc kháng thể nhị đặc hiệu chuỗi đơn. Theo phương án này, polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết cộng hóa trị với nhau, trong đó liên kết cộng hóa trị được xác định ở trên trong phần "Định nghĩa".

scTCR có thể bao gồm polypeptit của vùng biến đổi của chuỗi TCR đầu tiên (ví dụ, chuỗi alpha) và polypeptit của toàn bộ (chiều dài đầy đủ) chuỗi TCR thứ hai (ví dụ, chuỗi beta) hoặc ngược lại. Hơn nữa, scTCR có thể tùy chọn bao gồm một hoặc nhiều chất kết nối nối hai hoặc nhiều polypeptit lại với nhau. Ví dụ, chất kết nối có thể là peptit, nối hai chuỗi đơn với nhau, như được mô tả ở đây. Cũng được đề xuất là

scTCR như vậy của sáng chế, được hợp nhất với cytokin của người, ví dụ như IL-2, IL-7 hoặc IL-15. Theo một phương án, TCR chuỗi đơn nói trên ở trong một trong các định dạng chuỗi đơn được chọn từ nhóm chỉ chứa Valpha-L_t-Vbeta, Vbeta-L_t-Valpha, Valpha-Ca-L_t-Vbeta, Valpha-Cb-L_t-Vbeta, Valpha-L_t-Vbeta-Cb, Valpha-L_t-Vbeta-Ca, Valpha-Ca-L_t-Vbeta-Cb, Valpha-Cb-L_t-Vbeta-Ca, tốt hơn là Valpha-L_t-Vbeta, Vbeta-L_t-Valpha, trong đó Valpha là miền biến đổi thứ nhất như được định nghĩa ở trên và trong đó Vbeta là miền biến đổi thứ hai như được định nghĩa ở trên, Ca và Cb là các vùng hằng định TCR alpha và beta tương ứng có mặt hoặc không có mặt, và L_t là chất kết nối có mặt hoặc không có mặt và như được định nghĩa ở trên trong phần định nghĩa.

Theo một phương án, TCR chuỗi đơn này có thể còn bao gồm ít nhất một miền biến đổi khác, tốt hơn là một hoặc hai miền biến đổi khác, hoặc được liên kết đầu cuối C-hoặc N.

Theo một phương án, miền biến đổi khác này có thể được liên kết qua chất kết nối khác L_k. Theo một phương án được ưu tiên, chất kết nối L_k là chất kết nối như được xác định ở trên hoặc trình tự bản lề CH1 của trình tự axit amin SEQ ID NO: 114.

Sáng chế cũng bao gồm các hạt hiển thị các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, đặc biệt là các TCR, và việc bao gồm các hạt nói trên vào thư viện các hạt. Các hạt như vậy bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi thực khuẩn thể, nấm men, ribosome hoặc tế bào động vật có vú. Phương pháp tạo ra các hạt và các thư viện như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực này (ví dụ, xem WO2004/044004; WO01/48145, Chervin et al (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184).

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã chứng minh trong các ví dụ, cụ thể là trong ví dụ 3, rằng các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết với kháng nguyên đích, tức là, peptit kháng nguyên MAGE-A trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là trong phức hợp với HLA-A*02, với độ đặc hiệu cao, tức là, các protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc biệt với các yếu tố quyết định kháng nguyên đã được phát hiện.

Theo đó, các protein liên kết kháng nguyên liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' của SEQ ID NO: 1, trong đó peptit kháng nguyên này nằm trong phức hợp với protein MHC, tốt

hơn là tạo phức với HLA-A*02. Cụ thể hơn, theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên liên kết cụ thể với yếu tố quyết định kháng nguyên bao gồm hoặc chỉ chứa ít nhất ba hoặc ít nhất bốn vị trí axit amin của peptit kháng nguyên MAGE-A của SEQ ID NO: 1, tốt hơn là, ít nhất là 3, ít nhất là 4 vị trí axit amin, tốt hơn là ít nhất là 3, ví dụ như 3 hoặc 4, tốt hơn là 3, được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí axit amin 1, 5, 7 và 8 hoặc 1, 3, 5, 7 và 8, cụ thể là 1, 5 và 7 của trình tự axit amin SEQ ID NO: 1. Việc xác định yếu tố quyết định kháng nguyên chính xác có thể hơi khác nhau tùy thuộc vào phương pháp được sử dụng và các giá trị giới hạn được chọn. Do đặc tính liên kết chủ yếu với các vị trí axit amin 1, 5 và 7, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế không liên kết đáng kể với các peptit tương tự NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223 và ODC-001.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế không liên kết đáng kể với biến thể peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, trong đó ít nhất một trong các vị trí 1, 5 và 7, ít nhất một trong các vị trí 1, 5, 7 và 8, hoặc ít nhất một trong các vị trí 1, 3, 5, 7 và 8, được thay thế, tốt hơn là được thay thế thành một alanin.

"Không liên kết đáng kể" trong ngữ cảnh các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là các TCR hoặc các đoạn của chúng hoặc các TCR nhị đặc hiệu và các đoạn của chúng, ví dụ như các protein liên kết kháng nguyên biểu hiện tế bào T, được biểu thị, thường trong xét nghiệm chức năng, ví dụ, trong thử nghiệm kích hoạt TCR, ví dụ như giải phóng IFN-gamma được mô tả ở trên, phản hồi, ví dụ như tín hiệu được phát hiện, ví dụ, các biến thể peptit kháng nguyên, dưới 30%, dưới 25%, dưới 20%, dưới 15%, tốt hơn là dưới 30% của phản hồi, tức là, tín hiệu, thu được đối với peptit MAGE-A bao gồm trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' của SEQ ID NO: 1, tốt hơn là trong cùng điều kiện thử nghiệm. "Không liên kết đáng kể" trong ngữ cảnh của các biến thể peptit kháng nguyên và trong ngữ cảnh của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là các protein liên kết kháng nguyên hòa tan theo sáng chế, biểu thị, điển hình là trong một thử nghiệm liên kết, ví dụ như phép đo lường giao thoa sinh học, K_D được xác định cho biến thể peptit kháng nguyên được tăng nhiều hơn hơn hệ số 3, hơn 3,5, hơn 4, hơn 4,5, hơn 5, tốt hơn là hơn 3, ví dụ như từ 3 đến 10, so với K_D được xác định đối với peptit MAGE-A bao gồm trình tự axit amin

'KVLEHVVRV' có SEQ ID NO: 1, tốt hơn là trong cùng điều kiện thử nghiệm, trong đó tín hiệu thu được đối với các biến thể peptit kháng nguyên tốt hơn là tín hiệu nền, trong đó các biến thể peptit kháng nguyên hoặc peptit MAGE-A ở trong phức hợp với phân tử MHC.

Theo phần trên, theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là protein liên kết kháng nguyên hòa tan, liên kết với biến thể peptit kháng nguyên MAGE-A được mô tả ở trên trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là ở dạng phức hợp với HLA-A*02, với độ bám dính giảm so với độ bám dính với kháng nguyên cụ thể, tức là, peptit kháng nguyên MAGE-A như được mô tả trong ngữ cảnh của sáng chế trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là phức hợp với HLA-A*02, và trong đó K_D tương ứng cho phức hợp biến thể peptit kháng nguyên MAGE-A được tăng nhiều hơn hệ số 3, hơn 3,5, hơn 4, hơn 4,5, hơn 5, tốt hơn là hơn 3, ví dụ như từ 3 đến 10. Thuật ngữ "độ bám dính" và "K_D" được định nghĩa ở trên trong phần "Định nghĩa".

Các protein MHC, cụ thể là các protein MHC lớp I và HLA-A*02 được định nghĩa ở trên trong phần 'Định nghĩa'.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được đặc trưng là protein liên kết kháng nguyên bão hòa độ bám dính, có khả năng liên kết chọn lọc cụ thể và tùy chọn phức hợp peptit/MHC kháng nguyên MAGE-A.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết cụ thể với phức hợp peptit kháng nguyên MAGE-A như được nêu cụ thể ở trên, cụ thể hơn là với yếu tố quyết định kháng nguyên của SEQ ID NO: 1 như được định nghĩa ở trên và có thể phân biệt giữa mục tiêu tương ứng của nó, tức là, peptit kháng nguyên MAGE-A và các peptit tương tự, khác, mà nó liên kết không đáng kể.

Thuật ngữ "tính đặc hiệu" hoặc "liên kết cụ thể" biểu thị khả năng của protein liên kết kháng nguyên để phân biệt trình tự peptit đích mà trình tự peptit mục tiêu mà nó liên kết ("yếu tố quyết định kháng nguyên") với các yếu tố quyết định kháng nguyên, peptit hoặc protein tương tự, tức là, protein liên kết kháng nguyên "liên kết cụ thể" với kháng nguyên thứ nhất khi nó không có phản ứng chéo đáng kể với kháng nguyên thứ hai.

"Các peptit tương tự" trong ngữ cảnh của sáng chế cũng có thể được đề cập đến như là là "ngoài mục tiêu" và liên quan đến các peptit bao gồm chiều dài thường từ 8 đến 16 axit amin. Các peptit tương tự trong ngữ cảnh của sáng chế thường được trình bày MHC. Hơn nữa, các peptit tương tự theo sáng chế bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin tương tự như trình tự axit amin của peptit kháng nguyên MAGE-A, cụ thể hơn, là các peptit, so với các yếu tố quyết định kháng nguyên của peptit kháng nguyên MAGE-A, bao gồm yếu tố quyết định kháng nguyên trong đó một số hoặc tất cả các axit amin giống hệt nhau và/hoặc tương tự về các đặc điểm sinh hóa/lý sinh của các axit amin, so với các axit amin tạo thành yếu tố quyết định kháng nguyên của peptit MAGE-A tương ứng. Do sự giống nhau về trình tự này, các peptit tương tự có thể được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên, trong trường hợp này, ví dụ, nếu peptit tương tự được trình bày bởi protein MHC và do đó được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCR, khả năng của protein liên kết kháng nguyên nhất định, ví dụ như TCR, liên kết với peptit tương tự sẽ không dẫn đến phản ứng tế bào T mong muốn mà có thể dẫn đến phản ứng bất lợi. Các phản ứng bất lợi như vậy có thể là tác dụng phụ "ngoài khối u", ví dụ như phản ứng chéo của TCR cụ thể phản ứng chéo với peptit trong các mô khỏe mạnh như được báo cáo trong Lowdell et al., Cytotherapy, được xuất bản vào ngày 4 tháng 12 năm 2018, trang 7. Các peptit tương tự trong ngữ cảnh của sáng chế được chọn từ cơ sở dữ liệu của, ví dụ, các peptit liên kết HLA-A*02 được trình bày ở mô bình thường (cơ sở dữ liệu XPRESIDENT), ví dụ dựa trên sự tương tự về trình tự cao (tìm kiếm BLAST tương tự) với MAG-003. Do những phản ứng bất lợi này, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế do đó được thiết kế để tránh liên kết với các peptit tương tự, cụ thể là với các peptit tương tự được liệt kê ở dưới.

Theo đó, các peptit tương tự trong ngữ cảnh của sáng chế được chọn từ danh sách chỉ chứa peptit RABGAP1L-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 23, AXIN1-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 24, ANO5-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 25, TPX2-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 26, SYNE3-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27, MIA3-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, HERC4-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 29, PSME2-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 30, HEATR5A-001 chỉ chứa

trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, CNOT1-003 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 32, TEP1-003 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 33, PITPNM3-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 34, ZFC-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 129, INTS4-002 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 171, SAMH-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 172, PPP1CA-006 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 173, RPL-007 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 174, SETD1A-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 175, NOMAP-1-0320 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 176, NOMAP-1-1223 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 177 và ODC-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 178, COL6A3-010 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 179, FAM115A-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 180, PHTF2-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 181 và RPP1-001 chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 181.

Theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là các TCR hoặc các đoạn của chúng hoặc các TCR nhị đặc hiệu và các đoạn của chúng, ví dụ như các protein liên kết kháng nguyên biểu hiện tế bào T, không liên kết hoặc liên kết không đáng kể với ít nhất 1, ví dụ như ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ví dụ như 1, 2, 3, 4, 5, tốt hơn là ít nhất 3 hoặc 3 hoặc tất cả các peptit tương tự được chọn từ danh sách chỉ chứa RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TEP1-003, PITPNM3-001, HEATR5A-001, HERC4-001 và CNOT1-003, khi peptit tương tự nói trên nằm trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là phức hợp với HLA-A*02. Đây là lợi thế quan trọng trong ngữ cảnh của sáng chế vì việc liên kết với các peptit tương tự, tức là, ngoài mục tiêu, có thể làm tăng nguy cơ tác dụng phụ, theo đó, thực tế là các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế không phản ứng chéo với các peptit tương tự được liệt kê ở đây, làm cho nó trở thành phương pháp điều trị chống ung thư đầy hứa hẹn.

"Không liên kết đáng kể" cũng có thể được đề cập đến như là "không phản ứng chéo" trong ngữ cảnh của các peptit tương tự và trong ngữ cảnh của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là các TCR hoặc các đoạn của chúng hoặc các TCR nhị đặc hiệu và các đoạn của chúng, ví dụ như protein liên kết kháng nguyên biểu hiện tế bào T và ở đây, ví dụ, đề cập đến phản hồi chức năng được đo lường trong thử

nghiệm chức năng đối với protein liên kết kháng nguyên với peptit/MHC tương tự so với MAGE-A và trong đó phản hồi của protein liên kết kháng nguyên với các peptit/MHC tương tự là dưới 30%, dưới 20%, dưới 10%, dưới 5%, ví dụ như 8%, 6%, 5%, tốt hơn là 5% của phản hồi của cùng protein liên kết kháng nguyên với phức hợp peptit/MHC kháng nguyên MAGE-A trong cùng thiết lập thí nghiệm. Trong một ví dụ, phản hồi là phản hồi chức năng của các tế bào T biểu hiện protein liên kết kháng nguyên nói trên và được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giải phóng IFN-gamma như được mô tả ở trên và như được mô tả trong ví dụ 3 và Fig.5 trong ngữ cảnh của các peptit tương tự.

Hơn nữa, theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là protein liên kết kháng nguyên hòa tan theo sáng chế, không liên kết hoặc liên kết không đáng kể với ít nhất một peptit tương tự, ví dụ như ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ví dụ như 1, 2, 3, 4, 5, tốt hươn là ít nhất 3 hoặc 3 hoặc tất cả các peptit tương tự được chọn từ nhóm peptit chỉ chứa RABGAP1L-001, AXIN1-001, ANO5-001, TPX2-001, SYNE3-001, MIA3-001, HERC4-001, PSME2-001, HEATR5A-001, CNOT1-003, TEP1-003, PITPNM3-001, INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A-001, NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223, ODC-001, COL6A3-010, FAM115A-001, PHTF2-001 và RPP1-001 tốt nhất là CNOT1-003, SYNE3-001, TPX2-001, PSME2-001, tốt hơn là SYNE3-001, TPX2-001, PSME2-001 khi peptit tương tự nói trên nằm trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là phức hợp với HLA-A*02.

Trong một ví dụ, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là protein liên kết kháng nguyên hòa tan theo sáng chế, không liên kết hoặc liên kết không đáng kể với INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A- 001, NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223 và ODC-001, ví dụ như INTS4-002, SAMH-001, PPP1CA-006, RPL-007, SETD1A-001 hoặc NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223, ODC-001, COL6A3-010, FAM115A-001, PHTF2-001 và RPP1-001, ví dụ như PPP1CA-006, RPL-007 và SETD1A-001, khi peptit tương tự nói trên nằm trong phức hợp với protein MHC, tốt hơn là phức hợp với HLA-A*02.

"Không liên kết đáng kể" trong ngữ cảnh các peptit tương tự và trong ngữ cảnh các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như các protein liên kết kháng nguyên hòa tan

theo sáng chế, ở đây được đặc trưng bởi độ bám dính giảm, tốc độ phân ly nhanh hơn và/hoặc tín hiệu liên kết thấp hơn, cụ thể là tốc độ phân ly nhanh hơn và/hoặc tín hiệu liên kết thấp hơn. Ví dụ, trong ngữ cảnh của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên có phản hồi liên kết với ít nhất một phức hợp peptit/MHC tương tự là dưới 50%, dưới 45%, dưới 40%, dưới 30%, dưới 20%, dưới 10%, dưới 5%, dưới 4% hoặc dưới 3% phản hồi liên kết của cùng protein liên kết kháng nguyên với phức hợp peptit/MHC MAGE-A kháng nguyên trong cùng thiết lập thí nghiệm và ở cùng nồng độ protein liên kết kháng nguyên và/hoặc, ví dụ, trong ngữ cảnh của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên liên kết với ít nhất một phức hợp peptit/MHC tương tự với độ bám dính giảm so với độ bám dính với kháng nguyên cụ thể, tức là, phức hợp peptit/MHC kháng nguyên MAGE-A như được mô tả ở đây và trong đó K_D tương ứng đối với peptit tương tự tương ứng được tăng lên theo hệ số 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, tốt hơn là 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, tốt hơn là từ 20 đến 100, tốt hơn là từ 30 đến 100, ví dụ như từ 40 đến 100, thường là từ 40 đến 50. Ví dụ, khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với phức hợp MAG-003/MHC với K_D là 1 nM và protein liên kết kháng nguyên liên kết với phức hợp của, ví dụ, RABGAP1L-001/MHC với K_D là 100 nM sau đó protein liên kết kháng nguyên liên kết với RABGAP1L-001/MHC với K_D được tăng lên theo hệ số 100 và do đó, với độ bám dính giảm theo hệ số 100. Trong các ví dụ này, phản hồi liên kết, các hằng số phân ly và độ bám dính liên kết tốt hơn là được đo lường bằng phép đo lường giao thoa lớp sinh học như được mô tả trong, ví dụ, ví dụ 4 và 5. Trong một số ví dụ khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết với ít nhất một phức hợp peptit/MHC tương tự có độ bám dính giảm so với độ bám dính với kháng nguyên cụ thể, tức là, phức hợp peptit/MHC kháng nguyên MAGE-A như được mô tả ở đây, trong đó K_D tương ứng cho CNOT1-003 , INTS4-002 và SAMH-001 được tăng bởi hệ số trên 1000, đối với COL6A3-010, PHTF2-001, RPP1-001 và FAM115A-001 bởi hệ số trên 500, so với độ bám dính với kháng nguyên cụ thể, tức là, phức hợp MHC/peptit kháng nguyên MAGE-A, ví dụ, khi các giá trị K_D thường được đo lường bằng phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học như được mô tả trong ví dụ 5.

Trong ví dụ khác, protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như 114-iso1-BMA(36) hoặc 114-iso2-UCHT1(17), có phản hồi liên kết đối với ODC-001, NOMAP-1-0320

và NOMAP-1-1223 trong phức hợp MHC, mà là dưới 5%, dưới 4%, dưới 3%, dưới 2%, ví dụ như dưới 1,5%, khi được đo lường bằng phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học như được mô tả trong ví dụ 5.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên liên kết cụ thể với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và phân tử HLA, tốt hơn là HLA-A*02, với K_D là ≤100 μM, ≤50 μM, ≤30 μM, ≤25 μM, ≤1 μM, ≤500nM, ≤100nM, ≤50nM, ≤10nM, tốt hơn là từ 50pM đến 100μM, từ 50pM đến 10μM, từ 50pM đến 1μM, tốt hơn nữa là, từ 50pM đến 500nM, từ 50pM đến 100nM, từ 50pM đến 50nM và từ 50pM đến 10nM. Theo đó, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có độ bám dính (K_D) với peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với phân tử HLA, tốt hơn là HLA-A*02, mà là ≤200 nM, ≤150 nM, ≤120 nM, 110 nM, tốt hơn là ≤100 nM, cụ thể là từ 50 pM đến 100 nM, từ 100 pM đến 100 nM, từ 1 nM đến 100 nM. "K_D" và "độ bám dính" được định nghĩa ở trên trong phần "định nghĩa".

Các phương pháp đo lường độ bám dính, ví dụ như K_D được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, cộng hưởng plasmon bề mặt và phép đo lường giao thoa lớp sinh học. Như được biết đối với những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, các điều kiện thí nghiệm được sử dụng cho các thí nghiệm đó, ví dụ như dung dịch đệm được sử dụng, nồng độ của protein, có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Theo phương án liên quan, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là TCR hoặc đoạn của nó hoặc TCR nhị đặc hiệu hoặc đoạn của nó, ví dụ như protein liên kết kháng nguyên biểu hiện tế bào T, có độ bám dính (K_D) với phức hợp của peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và phân tử HLA, tốt nhất là HLA-A*02, mà là ≤100 μM, ≤50 μM, ≤30 μM, ≤25 μM, ≤1 μM, tốt hơn là ≤25 μM, ví dụ, từ 500nM đến 100μM, từ 500nM đến 50μM, từ 500nM đến 25μM.

Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể hòa tan. Các protein liên kết kháng nguyên hòa tan có thể bao gồm, ví dụ, không bị giới hạn bởi nó, kháng thể hoặc một đoạn của nó, hoặc kháng thể nhị đặc hiệu hoặc đoạn của nó, đoạn TCR hoặc TCR nhị đặc hiệu hoặc scTCR. Theo phương án liên

quan, protein liên kết kháng nguyên, tốt hơn là hòa tan, liên kết với phức hợp của peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và phân tử HLA, tốt hơn là HLA-A*02, với K_D mà là ≤100 nM, ≤50 nM, ≤10 nM, ≤1nM, ≤1 nM, ví dụ, từ 10pM đến 100 nM, từ 10 pM đến 50 nM, từ 10 pM đến 10 nM, cụ thể là từ 50pM đến 100 nM, từ 100 pM đến 50 nM, từ 100 pM đến 10 nM.

Theo đó, trong một ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được biểu hiện, ví dụ như TCER™ hòa tan được mô tả ở trên và được phân tích về độ bám dính liên kết của chúng đối với các monome HLA-A*02/MAG-003. Thông thường, các phép đo lường được thực hiện, ví dụ, trên hệ thống Octet RED384, thông thường, sử dụng các thiết lập do nhà sản xuất khuyến nghị. Tóm lại, động học liên kết thường được đo lường ở 30°C và, ví dụ, tốc độ lắc 1000 vòng/phút bằng cách sử dụng PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA làm chất đệm. Các protein liên kết kháng nguyên được nạp vào các bộ cảm biến sinh học, ví dụ như FAB2G hoặc AHC, hoặc được phân tích trong dung dịch.

Theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có độ bám dính được tăng lên, một cách tùy chọn, so với protein tham chiếu.

"Protein tham chiếu" ở đây đề cập đến protein mà protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được so sánh với. Theo một phương án, protein tham chiếu được hướng tới cùng mục tiêu, tức là, peptit kháng nguyên MAGE-A trong phức hợp với protein MHC, như là protein hiện tại, tốt hơn nữa là protein tham chiếu nói trên có cùng định dạng với protein liên kết kháng nguyên mà nó được so sánh. Theo một phương án cụ thể, protein tham chiếu có cùng định dạng với protein liên kết kháng nguyên mà nó được so sánh và protein tham chiếu bao gồm các CDR hoặc miền biến đổi alpha và beta của TCR R7P1D5 mẹ.

Như được bộc lộ ở đây, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế nhận biết và/hoặc liên kết với phức hợp của peptit kháng nguyên MAGE-A bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự axit amin 'KVLEHVVRV' của SEQ ID NO: 1 và phân tử HLA, tốt nhất là HLA-A*02. Do đó, MAG-003 và phân tử HLA có mặt trong phức hợp tương hợp mô chính (MHC) lớp I, và, sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên với phức hợp này có thể tạo ra phản hồi miễn dịch khi liên kết. Theo một số phương án, protein

liên kết kháng nguyên theo sáng chế tạo ra phản hồi miễn dịch tăng lên so với phản hồi miễn dịch được tạo ra bởi protein tham chiếu.

Theo đó, theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tạo ra phản hồi miễn dịch, tốt hơn là, trong đó phản hồi miễn dịch được đặc trưng bởi sự gia tăng các mức interferon (IFN) γ. Theo đó, trong một ví dụ, phản hồi miễn dịch có thể được đặc trưng bởi giá trị EC50 tốt hơn là được xác định trong xét nghiệm giải phóng IFN-gamma.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có giá trị EC_{50} [nM], tốt hơn là được xác định bằng giải phóng IFN-gamma, thấp hơn EC_{50} của protein tham chiếu, tốt hơn là protein liên kết kháng nguyên có EC_{50} [nM] gấp 2 lần, tốt hơn là, thấp hơn 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 lần, ví dụ như thấp hơn từ 2 đến 9 lần, so với giá trị EC_{50} [nM] của protein tham chiếu và trong đó giá trị EC_{50} là nồng độ của giải phóng IFN-gamma nửa cực đại [nM] được xác định trên MHC, tốt hơn là các tế bào biểu hiện HLA-A*02, tốt hơn là được nạp peptit kháng nguyên của SEQ ID NO: 1. Trong một ví dụ, EC_{50} được đề cập đến, được xác định bởi, điển hình là, ELISA, ví dụ, sau khi đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ được mạ điện với các tế bào T2 được nạp với dung dịch pha loãng nối tiếp của peptit kháng nguyên MAGE-A, tốt hơn là peptit kháng nguyên MAGE-A của SEQ ID NO: 1. Tốt hơn là, protein tham chiếu có cùng định dạng như protein liên kết kháng nguyên mà nó được so sánh và protein tham chiếu bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi alpha và beta của TCR R7P1D5 mẹ và trong đó EC_{50} tốt hơn là đã được xác định trong cùng thiết lập thí nghiệm.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có giá trị EC_{50}, tốt hơn là được xác định bằng xét nghiệm giải phóng IFN-gamma hoặc xét nghiệm giải phóng LDH, đối với các tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC mà là dưới 100nM, dưới 50nM, dưới 10nM, dưới 900pM, dưới 500pM, dưới 300pM, dưới 200pM, dưới 150pM, dưới 100pM, dưới 50pM, dưới 20pM, dưới 10pM, ví dụ như từ 0,1nM đến 20nM, ví dụ như 0,5nM và 15nM, 0,8 nM và 12nM, 0,8nM và 10nM, 0,8nM và 10nM, 0,8nM và 10nM hoặc ví dụ như giữa 1pM và 150pM, 1 và 100pM, 1 và 50pM, 1 và 20 pM, 1 và 20pM.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên là TCR và có EC_{50}, tốt hơn là được xác định bằng giải phóng IFN-gamma, đối với các tế bào thể hiện phức hợp

MAGE-A/MHC mà là dưới 12nM, dưới 10nM, dưới 9nM, dưới 8nM, dưới 6nM, dưới 4nM, ví dụ như từ 0,1nM đến 20nM, ví dụ như 0,5nM và 15nM, 0,8nM và 12nM, 0,8nM và 10nM, 0,8nM và 10nM, 0,8nM và 10nM.

Trong phương án này, EC_{50} được xác định bằng cách sử dụng các tế bào T CD8+ (20.000 tế bào/giếng) biểu hiện các protein liên kết kháng nguyên khác nhau theo sáng chế và bằng cách xác định các mức độ IFN-gamma được giải phóng khi đồng nuôi cấy với tế bào T2 (20.000 tế bào/giếng) được nạp với loạt pha loãng của MAG-003 (SEQ ID NO: 1).

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên là phân tử hòa tan, ví dụ như TCER™ và có EC_{50} đối với các tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC mà là dưới 200pM, dưới 150pM, dưới 100pM, dưới 50pM, dưới 20pM, dưới 10pM, từ 1pM đến 150pM, giữa 1 và 100pM, giữa 1 và 50pM, giữa 1 và 20 pM, giữa 1 và 20pM. Trong phương án này, EC_{50} được xác định bằng cách sử dụng các tế bào T CD8+ (20.000 tế bào/giếng) biểu hiện các protein liên kết kháng nguyên khác nhau theo sáng chế và bằng cách xác định mức LDH được giải phóng khi đồng nuôi cấy với các dòng tế bào khối u thể hiện MAG-003 ở các mức độ nội sinh, tốt hơn là, dòng tế bào là Hs695T thể hiện trên bề mặt của nó khoảng 1071 trong số các peptit MAG-003 phức hợp với protein MHC, tốt hơn là, dòng tế bào là NCI-H1755 trình bày trên bề mặt của nó khoảng 3918 trong số các peptit MAG-003 phức hợp với protein MHC, hoặc tốt hơn là, dòng tế bào là U2OS thể hiện trên bề mặt của nó khoảng 125 trong số các peptit MAG-003 trong phức hợp với protein MHC.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có tiểu sử an toàn cao.

"Tiểu sử an toàn" ở đây đề cập đến khả năng phân biệt tế bào khối u với tế bào mô khỏe mạnh và điều này thường được xác định bằng cách xác định cửa sổ an toàn.

"Cửa sổ an toàn" hoặc "cửa sổ trị liệu" ở đây đề cập đến hệ số so sánh nồng độ nửa cực đại của hợp chất được yêu cầu để gây ra 100% độc tế bào trong dòng tế bào khối u so với nồng độ nửa cực đại của hợp chất được yêu cầu để gây ra các tế bào mô khỏe mạnh độc tế bào 100%. Nếu đối với protein liên kết kháng nguyên quan tâm, EC_{50} được xác định cho dòng tế bào khối u là 1pM và giá trị EC_{50} được xác định, ví dụ, các tế bào sơ cấp là 1000pM thì cửa sổ an toàn là 1000 vì EC_{50} cho dòng tế bào khối u nhỏ hơn 1000 lần so với EC_{50} cho các tế bào sơ cấp.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có EC_{50} đối với tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC mà là ≥100, ≥500, ≥1000, ≥2000, ≥3000, ≥4000, ≥5000, ≥6000, ≥8000, ≥10000 cao hơn so với giá trị EC_{50} đối với tế bào khỏe mạnh, ví dụ như EC_{50} đối với tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC nằm trong khoảng từ 500 đến 12000, tốt hơn là từ từ 1000 đến 10000 cao hơn so với giá trị EC_{50} đối với tế bào khỏe mạnh.

"Tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC" ở đây đề cập đến tế bào thể hiện trên bề mặt của nó phức hợp peptit/MHC MAGE-A, trong đó số lượng bản sao của phức hợp MAGE-A/MHC này thường có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Theo một phương án, phức hợp MAGE-A/MHC là tế bào đích, ví dụ như tế bào ung thư, trong đó bệnh ung thư được định nghĩa ở dưới trong phần 'Các phương pháp và công dụng trị liệu'. Trong ngữ cảnh của sáng chế, phức hợp peptit/MHC MAGE-A được thể hiện quá mức trên bề mặt tế bào của tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC, cụ thể là tế bào ung thư, so với các mức độ của phức hợp nói trên trên bề mặt của các tế bào trong các mô bình thường (khỏe mạnh). "Thể hiện quá mức" theo sáng chế có nghĩa là phức hợp MAGE-A/MHC có mặt ở mức độ gấp ít nhất 1,2 lần so với mức độ có mặt trong mô bình thường; tốt hơn là gấp ít nhất 2 lần, và tốt hơn nữa là gấp ít nhất giữa 5 lần tới 10 lần mức độ có mặt trong mô hoặc các tế bào bình thường.

Theo một phương án, tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC có số lượng bản sao phức hợp MAGE-A/MHC là trên 50, trên 80, trên 100, trên 120, trên 150, trên 300, trên 400, trên 600, trên 800, trên 1000, trên 1500, trên 2000, tốt hơn là, số lượng bản sao MAGE-A/MHC là từ 50 đến 2000, ví dụ như từ 80 đến 2000, ví dụ như từ 100 đến 2000, ví dụ, từ 120 đến 2000.

"Số lượng bản sao" ở đây đề cập đến số lượng phức hợp MAGE-A/MHC như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế hiện diện trên bề mặt tế bào của tế bào, ví dụ như tế bào thể hiện MAGE-A/MHC, ví dụ, tế bào ung thư, hoặc tế bào khỏe mạnh. Số lượng bản sao của protein có thể được xác định bằng nhiều phương pháp đã biết bao gồm phân tích FACS của các tế bào bị bệnh với các protein liên kết kháng nguyên được được dán nhãn huỳnh quang.

"Tế bào khỏe mạnh" ở đây đề cập đến các tế bào không phải là tế bào ung thư, tốt nhất là các tế bào khỏe mạnh ở đây đề cập đến các tế bào của mô xung quanh tế bào thể hiện MAGE-A/MHC, các tế bào của mô bao quanh phức hợp MAGE-A/MHC thể hiện các tế bào ung thư. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, các tế bào khỏe mạnh cũng có thể thể hiện và hiện diện trên bề mặt phức hợp MAGE-A/MHC của chúng. Điển hình là trong các tế bào khỏe mạnh theo ngữ cảnh của sáng chế, vì nó sẽ được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, phức hợp MAGE-A/MHC hiện diện với số lượng nhỏ hơn (số lượng bản sao) so với trong tế bào ung thư.

Các tế bào khỏe mạnh được ưu tiên lựa chọn từ nhóm chỉ chứa các tế bào hình sao, các tế bào thần kinh GABAN (GABANeuron), các tế bào cơ tim, các tế bào nội mô vi mạch tim, các tế bào hình hạt, các tế bào nội mô động mạch coronery, các tế bào nội mô vi mạch da, các tế bào gốc trung mô, các tế bào biểu mô mũi, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi, các tế bào mạch máu tế bào, tốt hơn là các tế bào thần kinh GABAN, các tế bào cơ tim, các tế bào nội mô vi mạch tim, các tế bào chondrocytes, các tế bào nội mô động mạch vành, các tế bào biểu mô mũi, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi, các tế bào cơ trơn động mạch vành.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có EC_{50} đối với tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC mà là ≥1000, ≥15000, ≥9000 lần cao hơn so với giá trị EC_{50} đối với các tế bào khỏe mạnh, tốt hơn là tế bào khỏe mạnh được lựa chọn từ nhóm bao gồm các tế bào hình sao, các tế bào thần kinh GABAN, các tế bào cơ tim, các tế bào nội mô vi mạch tim, các tế bào chondrocytes, các tế bào nội mô động mạch vành, các tế bào nội mô vi mạch Derman, các tế bào gốc trung mô, các tế bào biểu mô mũi, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi, các tế bào sợi phổi, các tế bào cơ trơn, các tế bào biểu bì mô khí quản và các tế bào cơ trơn động mạch phổi, tốt hơn là các tế bào hình sao, các tế bào thần kinh đệm, các tế bào cơ tim, các tế bào nội mô vi mạch tim, các tế bào chondrocytes, các tế bào nội mô động mạch vành, các tế bào nội mô vi mạch ở da, các tế bào gốc trung mô, các tế bào biểu mô mũi, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi và các tế bào mạch máu ngoại vi tốt hơn là các tế bào thần kinh GABAN, các tế bào cơ tim, các tế bào nội mô vi mạch tim, tế bào chondrocytes, các tế bào nội mô

động mạch vành, các tế bào biểu mô mũi, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi, các tế bào cơ trơn động mạch vành.

Trong một phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên có EC_{50} đối với tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC mà là ≥9000 hoặc ≥10000 lần cao hơn so với giá trị EC_{50} đối với các tế bào khỏe mạnh, trong đó tốt hơn là các tế bào khỏe mạnh này được lựa chọn từ nhóm bao gồm các tế bào hình cầu có nguồn gốc từ iPSC, các tế bào thần kinh iGABAN, các tế bào cơ tim, các nguyên bào xương, các nguyên bào sợi phổi, các tế bào cơ trơn khí quản và các tế bào sừng biểu bì và các tế bào biểu mô vỏ thận.

Theo đó, theo một phương án, các tế bào khỏe mạnh có số lượng bản sao phức hợp MAGE-A/MHC là dưới 50, dưới 20, dưới 10, tốt hơn là số lượng bản sao phức hợp MAGE-A/MHC là dưới 10, tốt hơn là số lượng bản sao phức MAGE-A/MHC là giữa 0 và 10.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có EC_{50} đối với tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC mà là ≥100, ≥500, ≥1000, ≥2000, ≥3000, ≥4000, ≥5000, ≥6000 cao hơn so với giá trị EC_{50} cho các tế bào thể hiện peptit/MHC tương tự, ví dụ như EC_{50} cho các tế bào thể hiện phức hợp MAGE-A/MHC nằm trong khoảng từ 500 đến 12000, tốt hơn là 1000 và 12000 cao hơn giá trị EC_{50} cho các tế bào thể hiện peptit/MHC tương tự.

"Peptit tương tự" được định nghĩa ở trên.

Do đó, tế bào thể hiện peptit/MHC tương tự là tế bào thể hiện trên bề mặt tế bào của nó phức hợp peptit/MHC tương tự.

Theo một phương án, các tế bào thể hiện peptit/MHC tương tự có số lượng bản sao của peptit/MHC tương tự mà là trên 10, trên 20, trên 40, trên 50, trên 80, trên 100, trên 120, trên 150, trên 300, trên 400, trên 500, trên 800, tốt hơn là, số lượng bản sao peptit/MHC tương tự là từ 50 đến 1000, ví dụ như từ 50 đến 8000, ví dụ như từ 50 đến 500, ví dụ, từ 100 đến 500.

Sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên có thể gây ra sự thoái triển của khối u in vivo, cụ thể hơn là sự thoái triển hoàn chỉnh trong các điều kiện đã được thử nghiệm. Các protein liên kết kháng nguyên đã được điều chế và đánh giá ở các liều lượng khác nhau dựa trên mô hình khối u HS695T có thể đo lường được, được cấy vào

chuột NOG cái được ghép với PBMC của người (xem ví dụ 7). TCER™ nhắm tới MAG-003 (SEQ ID NO: 127 và 130, nhóm 3; SEQ ID NO: 135 và 136, nhóm 4) đã gây ra sự thuyên giảm hoàn toàn của khối u Hs695T ở tất cả các con chuột ở Ngày 18 cho đến khi kết thúc nghiên cứu vào Ngày 25 so với các mức đọ cơ bản là 86 mm^3 (nhóm 3) và 80 mm^3 (nhóm 4) tại ngày chọn ngẫu nhiên.

Theo đó, theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế ức chế hoặc làm giảm sự phát triển của khối u, đặc biệt, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế làm giảm thể tích trung bình của khối u ở mức trên 80%, trên 85%, trên 90%, trên 92, trên 94, trên 96, trên 98, trên 99%, ví dụ như từ 95% đến 100%, từ 96% đến 100%, từ 98% đến 100%, ví dụ như 98%, 99% hoặc 100%, tốt hơn là 100%, trong đó khối u này thuộc loại ung thư như được định nghĩa ở dưới trong phần 'Các phương pháp và công dụng trị liệu'. Trong một ví dụ, protein liên kết kháng nguyên gây ra sự thuyên giảm hoàn toàn trong khối u ung thư, trong đó ung thư được xác định ở dưới, ví dụ, trong dòng tế bào khối u ở người HS695T.

Theo một phương án, thời gian bán hủy (T1/2) của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là từ 6 đến 7 ngày, ví dụ như 6 hoặc 7 ngày.

Như có thể thấy rõ hơn từ các ví dụ, cụ thể là ví dụ 1 và Fig.1, các TCR nguyên bản, ví dụ như TCR R7P1D5 nguyên bản, không thể được biểu hiện ở dạng hòa tan cả trong nấm men cũng như trong các tế bào CHO. Trái ngược với điều này, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là các phân tử TCER™, tốt hơn là các phân tử TCER™ được mô tả ở đây không chỉ hòa tan mà còn có thể được biểu hiện trong tế bào CHO ở dạng biểu hiện nhất thời với lượng là >10 mg/L (nuôi cấy tế bào), >20 mg/L hoặc thậm chí 40 mg/L. Theo đó, theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được biểu hiện trong tế bào chủ có sản lượng cao, trong đó tế bào chủ tốt hơn là tế bào CHO, và trong đó tốt hơn là, sản lượng là trên 10, trên 15, 18, 20 , 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45 mg/L (nuôi cấy tế bào), ví dụ như từ 5 đến 50, từ 5 đến 45, từ 5 đến 40, từ 5 đến 35, từ 10 đến 35, từ 10 đến 30, từ 10 đến 25, từ 10 đến 20 mg/L (nuôi cấy tế bào). Trong một ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được biểu hiện trong các tế bào CHO-S được truyền nhiễm nhất thời, trong đó các tế bào được nuôi cấy ở T=0 với mật độ $4x10^6$/mL ở 37°C trong môi trường GE Healthcare™ với tổng thể tích là 320 mL. Sau một ngày, dung dịch cấp liệu

(CellBoost 7a và b) được thêm vào và nhiệt độ được hạ xuống 32°C. Các tế bào và do đó protein liên kết kháng nguyên được thu hoạch sau tổng thời gian nuôi cấy là 12 ngày và tổng cộng ba lần cấp liệu.

Như có thể thấy rõ hơn từ các ví dụ, các tác giả sáng chế đã chứng minh, ví dụ, trong ví dụ 4 và 5, rằng các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có độ ổn định được cải thiện, so với protein tham chiếu, ví dụ, so với protein liên kết kháng nguyên bao gồm các CDR của TCR R7P1D5 nguyên bản và tốt hơn là các vùng khung của TCR R7P1D5 nguyên bản nói trên.

Theo đó, theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có độ ổn định được cải thiện, tùy chọn, so với protein tham chiếu. Trong ngữ cảnh của sáng chế, độ ổn định được cải thiện ví dụ như độ ổn định vật lý tăng lên khi tiếp xúc với ứng suất nhiệt. Do đó, các protein liên kết kháng nguyên mới được phát triển theo sáng chế có thể chịu được các điều kiện ứng suất, đặc biệt là ứng suất nhiệt tốt hơn so với protein liên kết kháng nguyên tham chiếu.

Thuật ngữ "độ ổn định" trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến độ ổn định vật lý và có thể được đánh giá về mặt định tính và/hoặc định lượng bằng cách sử dụng các kỹ thuật phân tích khác nhau được mô tả trong lĩnh vực này và được xem xét trong, ví dụ, Peptit and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) và Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Trong ngữ cảnh của sáng chế, các phương pháp đó đặc biệt đề cập đến việc đánh giá sự hình thành tổng hợp (ví dụ, sử dụng sắc ký loại trừ kích thước, bằng cách đo lường độ đục, và/hoặc bằng cách kiểm tra bằng mắt. Để đo lường độ ổn định, mẫu chứa protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được thử nghiệm trong nghiên cứu độ ổn định, trong đó mẫu được tiếp xúc trong một khoảng thời gian đã chọn với điều kiện ứng suất, sau đó là phân tích định lượng và, tùy chọn, định tính, về độ ổn định hóa học và vật lý bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích thích hợp.

Theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là ổn định về mặt vật lý, ví dụ, khi tiếp xúc với điều kiện ứng suất trong thời gian nhất định, ví dụ như khi tiếp xúc với nhiệt độ 40°C, ví dụ như khi tiếp xúc trong 14 ngày.

"Độ ổn định vật lý" về cơ bản, trong ngữ cảnh của sáng chế, đề cập đến protein liên kết kháng nguyên không có dấu hiệu kết tụ, kết tủa và/hoặc biến tính.

Các phương pháp để đạt được độ ổn định vật lý là sắc ký loại trừ kích thước (size exclusion chromatography - SEC), tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS), che khuất ánh sáng (light obscuration - LO) và màu sắc và độ trong, ví dụ, được xác định bằng cách kiểm tra bằng mắt.

"Không có dấu hiệu kết tụ" có nghĩa là, ví dụ, mẫu bao gồm protein liên kết kháng nguyên, sau khi được tiếp xúc với điều kiện ứng suất, ví dụ như, ở nhiệt độ 40°C trong 14 ngày trong chất đệm, ví dụ như PBS, có hàm lượng monome là trên 0%, trên 86%, trên 88%, trên 90%, trên 92%, trên 94%, trên 96%, trên 97%, trên 98%, trên 99%, ví dụ như hàm lượng monome là từ 94% đến 99%, từ 95% đến 99%, từ 96% đến 99%, từ 97% đến 99% hàm lượng monome, khi được đo lường bằng SEC, ví dụ như SEC-HPLC, trong chất đệm, ví dụ như PBS.

Theo đó, theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có khả năng kết tụ giảm, ví dụ, so với protein tham chiếu khi tiếp xúc với điều kiện ứng suất.

Đối với sắc ký loại trừ kích thước (SEC), sự khác biệt 1%, 2%, 3%, 4%, tốt hơn là 1 hoặc 2%, ví dụ như 2%, của hàm lượng monome được coi là khác biệt đáng kể trong ngữ cảnh của sáng chế theo các điều kiện được thử nghiệm tùy thuộc vào cột được sử dụng, áp suất vận hành, và tốc độ của chất đệm.

Điều này có nghĩa là, khi protein liên kết kháng nguyên tham chiếu có hàm lượng monome là 96% và protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hàm lượng monome là 97%, hàm lượng monome của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế sẽ khác đáng kể và do đó được tăng lên đáng kể so với protein liên kết kháng nguyên tham chiếu, khi được đo lường trong cùng điều kiện.

Theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có khả năng kết tụ giảm khi được tiếp xúc với điều kiện ứng suất, cụ thể hơn là, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có dưới 10%, dưới 4%, dưới 3%, dưới 2% kết tụ khi các kết tụ do ứng suất gây ra được đo lường trước và sau khi tiếp xúc với điều kiện ứng suất nói trên.

Axit nucleic, vectơ và tế bào chủ tái tổ hợp

Mục đích khác của sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic được phân lập bao gồm hoặc chỉ chứa trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế như được định nghĩa ở trên.

Thông thường, axit nucleic đã nói là phân tử DNA hoặc RNA, có thể được bao gồm trong bất kỳ vectơ thích hợp nào, ví dụ như plasmid, cosmid, epome, nhiễm sắc thể nhân tạo, phage hoặc vectơ virus.

Các thuật ngữ "vectơ", "vectơ nhân bản" và "vectơ biểu hiện" có nghĩa là phương tiện mà trình tự DNA hoặc RNA (ví dụ, gen ngoại lai) có thể được đưa vào tế bào chủ, để biến đổi vật chủ và thúc đẩy sự biểu hiện (ví dụ, sự phiên mã và dịch mã) của trình tự được đưa vào.

Vì vậy, mục đích khác của sáng chế đề cập đến vectơ chứa axit nucleic theo sáng chế.

Các vectơ như vậy có thể bao gồm các yếu tố điều chỉnh, ví dụ như chất thúc đẩy, chất tăng cường, chất kết thúc và tương tự, để gây ra hoặc hướng biểu hiện của polypeptit nói trên khi sử dụng cho chủ thể. Ví dụ về chất thúc đẩy và chất tăng cường được sử dụng trong vector biểu hiện của tế bào động vật bao gồm chất thúc đẩy sớm và chất tăng cường SV40 (Mizukami T. et al. 1987), chất thúc đẩy và chất tăng cường LTR của virut bệnh bạch cầu chuột Moloney (Kuwana Y et al. 1987), chất thúc đẩy (Mason JO et al. 1985) và chất tăng cường (Gillies SD et al. 1983) của chuỗi globulin miễn dịch H và tương tự.

Bất kỳ vectơ biểu hiện nào cho tế bào động vật đều có thể được sử dụng, miễn là có thể chèn và biểu hiện gen mã hóa vùng kháng thể C của người. Ví dụ về các vectơ phù hợp gồm pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4- (Miyaji H et al. 1990) và tương tự. Các ví dụ khác về plasmid bao gồm plasmid sao chép bao gồm nguồn gốc sao chép, hoặc plasmid tích hợp, ví dụ như pUC, pcDNA, pBR, và tương tự.

Các ví dụ khác về vectơ virút bao gồm adenovirut, retrovirut, virut herpes và các vectơ AAV. Những virut tái tổ hợp này có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ như bằng cách truyền nhiễm các tế bào đóng gói hoặc bằng cách truyền nhiễm nhất thời với plasmid hoặc virut trợ giúp. Ví dụ điển hình về các tế

bào đóng gói virut gồm các tế bào PA317, các tế bào PsiCRIP, các tế bào GPenv+, các tế bào 293, v.v. Các giao thức chi tiết để sản xuất virut tái tổ hợp bị lỗi sao chép như vậy có thể được tìm thấy, ví dụ như trong WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 và WO 94/19478.

Thuật ngữ "vectơ virut" dùng để chỉ cấu trúc vectơ axit nucleic bao gồm ít nhất một phần tử có nguồn gốc virut và có khả năng được đóng gói thành hạt vectơ virut và mã hóa ít nhất một axit nucleic ngoại sinh. Vectơ và/hoặc hạt có thể được sử dụng cho mục đích chuyển bất kỳ axit nucleic nào vào tế bào in vitro hoặc in vivo. Nhiều dạng vectơ virut đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ "hạt virut" ("virion) được sử dụng để chỉ một hạt virut lây nhiễm đơn lẻ. "Vectơ virut", "hạt vectơ virut" và "hạt virut" cũng dùng để chỉ một hạt virut hoàn chỉnh có lõi DNA hoặc ARN và lớp áo protein khi nó tồn tại bên ngoài tế bào. Ví dụ, vectơ virus có thể được chọn từ các adenovirus, các poxvirus, các alphavirus, các arenavirus, các flavirus, các rhabdovirus, các retrovirus, các lentivirus, các herpesvirus, các paramyxovirus hoặc các picornavirus.

Các virut có thể đề cập đến các virut tự nhiên cũng như các virut nhân tạo. Các virut theo một số phương án của sáng chế có thể là virut có vỏ bọc hoặc không có vỏ bọc. Các parvovirus (ví dụ như AAV) là những ví dụ về các virus không có vỏ bọc. Theo một phương án được ưu tiên, các virut có thể là các virut có vỏ bọc. Trong các phương án được ưu tiên, các virut có thể là virut retrovirus và đặc biệt là lentivirus. Các protein vỏ bọc virus có thể thúc đẩy sự lây nhiễm virut của tế bào nhân thực có thể bao gồm các vectơ lentivirus có nguồn gốc HIV-1 (lentiviral vector - LV) được tạo mẫu với các glycoprotein vỏ bọc (GP) từ virut viêm miệng mụn nước (VSV-G), virut retrovirus nội sinh ở mèo biến đổi (RD114TR), và virut bệnh bạch cầu vượn biến đổi (GALVTR). Các protein vỏ bọc này có thể thúc đẩy sự xâm nhập của các loại virut khác, ví dụ như parvovirus, bao gồm cả virut liên kết với adeno (adeno-associated virus - AAV), do đó chứng tỏ hiệu quả rộng rãi của chúng. Ví dụ, các protein vỏ bọc virut khác có thể được sử dụng bao gồm cả virut gây bệnh bạch cầu chuột Moloney (MLV) 4070 env (như được mô tả trong Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005; nội dung của chúng được đưa vào đây để tham chiếu), RD114 env, protein vỏ bọc hợp thể RD114pro hoặc RDpro (là hợp thể RD114-HIV được tạo ra bằng cách thay thế trình tự

phân cắt peptit R của RD114 bằng trình tự phân cắt ma trận/capsid HIV-1 (MA/CA), ví dụ như được mô tả trong Bell et al. Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 1269–1276; nội dung được đưa vào đây để tham khảo), baculovirus GP64 env (ví dụ như được mô tả trong Wang et al., J. Virol. 81: 10869-10878 , 2007; nội dung được đưa vào đây để tham khảo), hoặc GALV env (ví dụ như được mô tả trong Merten et al.,, J. Virol. 79: 834-840, 2005; nội dung được đưa vào đây để tham khảo), hoặc các dẫn xuất của chúng.

Mục đích của sáng chế đề cập đến tế bào chủ đã được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nạp với axit nucleic và/hoặc vectơ theo sáng chế.

Thuật ngữ "biến nạp" ban đầu dùng để chỉ quá trình diễn ra tự nhiên của việc chuyển gen vào tế bào chủ, liên quan đến sự hấp thụ vật chất di truyền, ví dụ như các axit nucleic, ví dụ như DNA hoặc RNA, bởi màng tế bào qua tế bào, để tế bào chủ sẽ biểu hiện gen hoặc trình tự được đưa vào để tạo ra chất mong muốn, điển hình là protein hoặc enzym được mã hóa bởi gen hoặc trình tự được đưa vào. Có hai loại được gọi là biến nạp tự nhiên và biến nạp nhân tạo hoặc cảm ứng. Phương pháp biến nạp nhân tạo hoặc cảm ứng được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm và thường được gọi là chuyển nạp.

Tế bào chủ nhận và biểu hiện các axit nucleic ngoại lai, ví dụ như DNA hoặc RNA, bằng quá trình biến nạp đã được "biến nạp".

Thuật ngữ “chuyển nạp” đề cập đến chế độ chuyển gen liên quan đến việc tạo ra các lỗ trên màng tế bào của tế bào chủ, cho phép tế bào chủ nhận vật chất di truyền ngoại lai. Điển hình, sự chuyển nạp đề cập đến sự biến nạp của các tế bào nhân thực, ví dụ như tế bào côn trùng hoặc động vật có vú. Sự chuyển nạp qua trung gian hóa học liên quan đến việc sử dụng, ví dụ, canxi photphat hoặc polyme cation hoặc liposome. Các phương pháp chuyển nạp không qua trung gian hóa học thường là điện phân, siêu âm, khử nhiễm, chuyển nạp quang hoặc phân phối thủy động lực. Chuyển nạp dựa trên hạt sử dụng kỹ thuật súng bắn gen trong đó hạt nano được sử dụng để chuyển axit nucleic đến tế bào chủ hoặc bằng phương pháp khác được gọi là chuyển gen bằng từ tính. Chuyển gen bằng xung điện và sử dụng sốc nhiệt là những phương pháp phát triển khác để chuyển gen thành công. Tế bào chủ nhận được các axit nucleic ngoại lai thông qua phương pháp chuyển nạp đã được "chuyển nạp".

Thuật ngữ "tải nạp" thường được hiểu là liên quan đến việc chuyển các axit nucleic ngoại lai, ví dụ như DNA hoặc RNA, vào tế bào bởi virut hoặc vectơ virut. Tế bào chủ nhận và biểu hiện các axit nucleic ngoại lai, ví dụ như DNA hoặc RNA, bởi virut hoặc vectơ virut đã được "tải nạp".

Theo một số phương án, các tế bào có thể được tải nạp bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong US20190216852, toàn bộ nội dung của phương pháp này được đưa vào để tham khảo.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp theo sáng chế trong hệ thống biểu hiện thích hợp.

Thuật ngữ "hệ thống biểu hiện" có nghĩa là tế bào chủ và vectơ tương thích trong các điều kiện thích hợp, ví dụ, để biểu hiện protein được mã hóa bởi DNA ngoại lai được mang bởi vector và được đưa vào tế bào chủ.

Các hệ thống biểu hiện phổ biến gồm các tế bào chủ E. coli và các vectơ plasmid, các tế bào chủ côn trùng và các vectơ Baculovirus, và các tế bào và vectơ chủ của động vật có vú. Các ví dụ khác về tế bào chủ gồm nhưng không bị giới hạn bởi, các tế bào nhân sơ (như vi khuẩn) và các tế bào nhân thực (như tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, v.v.). Các ví dụ cụ thể gồm các loại nấm men E. coli, Kluyveromyces hoặc Saccharomyces, các dòng tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào Vero, tế bào CHO, tế bào 3T3, tế bào COS, v.v.) cũng như các tế bào động vật có vú được nuôi cấy sơ cấp hoặc được thành lập (ví dụ, được sản xuất từ nguyên bào lympho, nguyên bào sợi, tế bào phôi, tế bào yếu tố quyết định kháng nguyên, tế bào thần kinh, tế bào mỡ, v.v.). Các ví dụ cũng bao gồm tế bào SP2/0-Ag14 của chuột (ATCC CRL1581), tế bào P3X63-Ag8.653 của chuột (ATCC CRL1580), tế bào CHO trong đó gen dihydrofolat reductase (sau đây được gọi là "gen DHFR") bị lỗi (Urlaub G et al; 1980), tế bào YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 chuột (ATCC CRL1662, sau đây được gọi là "tế bào YB2/0"), và tương tự. Theo một số phương án, tế bào YB2/0 có thể được ưu tiên hơn, vì hoạt tính ADCC của kháng thể hợp thể hoặc được nhân được tăng cường khi được biểu hiện trong tế bào này.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ chứa cấu trúc nhận biết kháng nguyên phù hợp với sáng chế. Cụ thể, tế bào chủ theo sáng chế bao gồm axit nucleic, hoặc vectơ như được mô tả ở trên. Tế bào chủ có thể là tế bào nhân thực, ví dụ, thực vật, động vật,

nấm, hoặc tảo, hoặc có thể là tế bào nhân sơ, ví dụ, vi khuẩn hoặc động vật nguyên sinh. Tế bào chủ có thể là tế bào được nuôi cấy hoặc tế bào sơ cấp, tức là, được phân lập trực tiếp từ sinh vật, ví dụ, con người. Tế bào chủ có thể là tế bào kết dính hoặc tế bào lơ lửng, tức là, tế bào phát triển trong huyền phù. Đối với mục đích sản xuất protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCR, polypeptit hoặc protein tái tổ hợp, tế bào chủ tốt hơn là tế bào động vật có vú. Tốt nhất là, tế bào chủ là tế bào người. Trong khi tế bào chủ có thể thuộc bất kỳ loại tế bào nào, có thể bắt nguồn từ bất kỳ loại mô nào, và có thể thuộc bất kỳ giai đoạn phát triển nào, tế bào chủ tốt hơn là bạch cầu máu ngoại vi (peripheral blood leukocyte - PBL) hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC). Tốt hơn nữa là, tế bào chủ là tế bào T. Tế bào T có thể là bất kỳ tế bào T nào, ví dụ như tế bào T được nuôi cấy, ví dụ, tế bào T sơ cấp hoặc tế bào T từ dòng tế bào T được nuôi cấy, ví dụ, Jurkat, SupT1, v.v., hoặc tế bào T thu được từ động vật có vú, tốt hơn là tế bào T hoặc tiền thân tế bào T từ bệnh nhân người. Nếu được lấy từ động vật có vú, tế bào T có thể được lấy từ nhiều nguồn, bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi máu, tủy xương, hạch bạch huyết, tuyến ức, hoặc các mô hoặc chất lỏng khác. Tế bào T cũng có thể được làm giàu hoặc được tinh chế. Tốt hơn là, tế bào T là tế bào T của người. Tốt hơn nữa là, tế bào T là tế bào T được phân lập từ con người. Tế bào T có thể là bất kỳ loại tế bào T nào và có thể thuộc bất kỳ giai đoạn phát triển nào, bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi, tế bào T trợ giúp dương tính với CD4 và/hoặc CD8, dương tính với CD4, ví dụ, tế bào Th1 và Th2, tế bào T dương tính cới CD8 (ví dụ, tế bào T gây độc tế bào), tế bào thâm nhiễm khối u (TIL), tế bào T bộ nhớ, tế bào T non, và tương tự. Tốt hơn là, tế bào T là tế bào T dương tính với CD8 hoặc tế bào T dương tính với CD4. Tế bào chủ tốt nhất là tế bào T phản ứng khối u đặc hiệu cho các tế bào khối u biểu hiện MAGEA4 và/hoặc MAGEA8.

Theo phần trên, theo một phương án, sáng chế đề cập đến tế bào chủ bao gồm protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được định nghĩa ở trên, hoặc axit nucleic, hoặc vectơ theo sáng chế, trong đó tế bào chủ này tốt hơn là a) tế bào lympho, ví dụ như tế bào lympho T hoặc tế bào tiền thân của tế bào lympho T, ví dụ tế bào T dương tính với CD4 hoặc CD8 hoặc b) tế bào biểu hiện tái tổ hợp, ví dụ như tế bào Buồng trứng Chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO).

Cụ thể, để biểu hiện một số protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, vectơ biểu hiện có thể thuộc loại trong đó gen mã hóa polypeptit thứ nhất, ví dụ như chuỗi nặng kháng thể hoặc chuỗi alpha, và gen mã hóa thứ hai polypeptit, ví dụ như chuỗi nhẹ kháng thể hoặc chuỗi beta, tồn tại trên các vectơ riêng biệt hoặc thuộc loại trong đó cả hai gen đều tồn tại trên cùng một vectơ (loại song song). Để dễ dàng xây dựng vectơ biểu hiện protein liên kết kháng nguyên, dễ dàng đưa vào tế bào động vật, và cân bằng giữa các mức độ biểu hiện của các chuỗi kháng thể H và L trong tế bào động vật, vectơ biểu hiện kháng thể được nhân hóa của loại song song được ưu tiên (Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 ngày 3 tháng 1; 167 (1-2): 271-8). Ví dụ về vectơ biểu hiện kháng thể được nhân hóa loại song song bao gồm pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 và tương tự.

Theo một phương án, các tế bào chủ tái tổ hợp như vậy có thể được sử dụng để sản xuất ít nhất một protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Các phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên như được định nghĩa ở trên, bao gồm

a. cung cấp tế bào chủ thích hợp,

b. cung cấp cấu trúc di truyền bao gồm trình tự mã hóa mã hóa protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế,

c. đưa cấu trúc di truyền đã nói vào tế bào chủ thích hợp nói trên, và

d. biểu hiện cấu trúc di truyền nói trên bằng tế bào chủ thích hợp nói trên, và tùy chọn

e. lựa chọn các tế bào biểu hiện và/hoặc tiết ra kháng thể nói trên.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được định nghĩa ở trên trong phần tương ứng.

"Cấu trúc di truyền" ở đây biểu thị các axit nucleic cho phép biểu hiện vùng mã hóa trong vật chủ, và do đó đề cập đến axit nucleic, ví dụ như các vectơ, được mô tả ở trên hoặc RNA.

Theo một phương án, phương pháp này có thể còn bao gồm bước thể hiện bề mặt tế bào của cấu trúc nhận biết kháng nguyên nói trên trên tế bào chủ thích hợp nói trên.

Theo các phương án được ưu tiên khác, cấu trúc di truyền trong b) bao gồm axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Các axit nucleic này được định nghĩa ở trên trong phần "axit nucleic, vectơ và tế bào chủ tái tổ hợp".

Theo phương án có liên quan, cấu trúc di truyền là cấu trúc biểu hiện bao gồm trình tự trình tự thúc đẩy được được liên kết chức năng với trình tự mã hóa nói trên.

Theo phương án có liên quan, các cấu trúc di truyền được đưa vào vật chủ thích hợp bằng cách sử dụng biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nạp. Biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nạp được định nghĩa trong phần ở trên.

Đáng mong đợi, hệ thống chuyển nạp để đưa cấu trúc di truyền vào tế bào chủ thích hợp nói trên là hệ thống vectơ retrovirus hoặc lentivirus như được mô tả ở trên trong phần axit nucleic, vectơ và tế bào chủ tái tổ hợp. Các hệ thống như vậy đã được biết đến bởi những người thuộc lĩnh vực này.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm việc phân lập và tinh chế protein liên kết kháng nguyên từ tế bào chủ và, tùy chọn, tái tạo protein liên kết kháng nguyên trong tế bào T.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng bất kỳ kỹ thuật nào đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ như, nhưng không bị giới hạn bởi, bất kỳ kỹ thuật hóa học, sinh học, di truyền hoặc enzym nào, một cách đơn lẻ hoặc kết hợp.

Theo một số phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có kháng thể hoặc khung giống như globulin miễn dịch.

Các kỹ thuật tiêu chuẩn để sản xuất polypeptit, ví dụ như các kháng thể hoặc các đoạn của chúng và các TCR hoặc các đoạn của chúng, đã được biết đến trong lĩnh vực này và những kỹ thuật này có thể được chuyển giao bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sang các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Ví dụ, chúng có thể được tổng hợp bằng phương pháp pha rắn được biết đến rộng rãi, đặc biệt là sử dụng thiết bị tổng hợp peptit bán sẵn trên thị trường (ví dụ như thiết bị do Applied Biosystems, Foster City, California sản xuất) và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo cách khác, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ như các kháng thể hoặc đoạn của chúng và các TCR hoặc các đoạn của chúng, có thể được tổng hợp bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp như đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, các đoạn có thể thu được dưới dạng các sản phẩm biểu hiện DNA sau khi kết hợp

các trình tự DNA mã hóa (poly)peptit mong muốn thành các vectơ biểu hiện và đưa các vectơ đó vào các vật chủ thích hợp của sinh vật nhân thực hoặc sinh vật nhân sơ mà sẽ biểu hiện polypeptit mong muốn, từ đó chúng có thể sau đó được phân lập bằng cách sử dụng các kỹ thuật nổi tiếng.

Trong một ví dụ, tức là, trong trường hợp các phân tử nhị đặc hiệu TCER™, các trình tự DNA mã hóa cho các tổ hợp khác nhau của VH và VL và alpha biến đổi (Valpha) và beta biến đổi (Vbeta), cũng như các trình tự mã hóa cho các chất kết nối có thể được thu bằng, ví dụ, tổng hợp gen. Các trình tự DNA kết quả có thể được nhân bản trong khung thành vectơ biểu hiện mã hóa cho vùng bản lề, vùng C_{H2} và C_{H3} được dẫn xuất từ, ví dụ, IgG4 của người [Accession #: K01316] và IgG1 [Accession #: P01857], tương ứng, và có thể được thiết kế thêm. Việc thiết kế có thể được thực hiện để kết hợp các đột biến núm thành lỗ vào miền C_{H3} có và không có sự ổn định liên kết disulfua liên chuỗi bổ sung; để loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa trong C_{H2} (ví dụ, đột biến N297Q); để tạo ra các đột biến làm im lặng Fc hoặc đưa thêm sự ổn định liên kết disulfua vào VL và VH, tương ứng, theo các phương pháp được mô tả bởi Reiter et al. (Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. Biochemistry, 1994, 33, 5451 – 5459); để bao gồm các đột biến tăng cường tính ổn định hoặc khả năng sản xuất.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy một cách thích hợp bằng quy trình tinh chế globulin miễn dịch, ví dụ như, protein A-Sepharose, protein L-Sepharose, protein G-Sepharose, sắc ký hydroxylapatite, điện di gel, thẩm tách hoặc sắc ký độ bám dính.

Theo một phương án, việc thu hồi các protein hoặc polypeptit liên kết kháng nguyên được biểu hiện ở đây đề cập đến việc thực hiện sắc ký protein A, sắc ký protein L, sắc ký chọn lọc Kappa và/hoặc sắc ký loại trừ kích thước, tốt hơn là sắc ký protein L và/hoặc sắc ký loại trừ kích thước, tốt hơn là sắc ký protein L và sắc ký loại trừ kích thước.

Các phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên quan đến kỹ thuật chuyển gen và DNA tái tổ hợp đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này (Xem Morrison SL. et ạ. (1984) và các tài liệu bằng sáng chế US5,202,238; và US5,204, 244).

Hơn nữa, các phương pháp sản xuất kháng thể được nhân hóa dựa trên DNA tái tổ hợp và kỹ thuật chuyển gen thông thường đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này (Xem, ví dụ, Riechmann L. et al., 1988; Neuberger MS. Et al. 1985) và có thể dễ dàng được áp dụng cho sản xuất các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Trong một ví dụ, các vectơ để biểu hiện các protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp theo sáng chế được thiết kế dưới dạng mono-cistronic, ví dụ, được điều khiển bởi các phần tử chất thúc đẩy có nguồn gốc HCMV, dẫn xuất pUC19. Ví dụ, DNA plasmid được khuếch đại ở E.coli theo các phương pháp nuôi cấy tiêu chuẩn và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng các kit thử bán sẵn trên thị trường (Macherey & Nagel). DNA plasmid tinh khiết được sử dụng cho sự chuyển nạp nhất thời của, ví dụ, các tế bào CHO-S theo hướng dẫn của nhà sản xuất (hệ thống ExpiCHO™; Thermo Fisher Scientific) hoặc tận dụng các hệ thống kết hợp điện (MaxCyte STX). Ví dụ, các tế bào CHO được chuyển nạp được nuôi cấy trong 6-14 ngày, ví dụ, ở nhiệt độ 32°C đến 37°C và nhận một đến hai cấp liệu là dung dịch ExpiCHO™ Feed hoặc dung dịch Cellboost 7a và 7b (GE Healthcare™).

Ví dụ, dịch nổi trên bề mặt tế bào được điều hòa được làm sạch bằng cách sử dụng bộ lọc (0,22 µm), ví dụ, bằng cách sử dụng Bộ trợ lọc phòng thí nghiệm (Lab Filter Aid) Sartoclear Dynamics® (Sartorius). Ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu được tinh chế bằng cách sử dụng hệ thống Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences) được trang bị để thực hiện sắc ký độ bám dính và loại trừ kích thước theo dòng. Sắc ký độ bám dính được thực hiện, ví dụ, trên cột protein A hoặc L (GE Lifesciences) theo các quy trình sắc ký độ bám dính tiêu chuẩn. Ví dụ, sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện trực tiếp sau khi rửa giải (pH 2,8) từ cột độ bám dính để thu được protein đơn phân tinh khiết cao bằng cách sử dụng cột Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) theo quy trình chuẩn. Ví dụ, nồng độ protein được xác định trên hệ thống NanoDrop (Thermo Scientific) bằng cách sử dụng hệ số tắt tính toán theo trình tự protein được dự đoán. Nồng độ được điều chỉnh, nếu cần, bằng cách sử dụng thiết bị Vivaspin (Sartorius). Cuối cùng, các phân tử tinh khiết được lưu trữ trong, ví dụ, nước muối đệm phosphat ở nồng độ khoảng 1 mg/mL ở nhiệt độ 2-8°C.

Chất lượng của protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu tinh khiết được xác định, ví dụ, HPLC-SEC trên các cột MabPac SEC-1 (5 µm, 4x300 mm) chạy trong, ví

dụ, 50 mM natri-phosphat pH 6,8 chứa 300 mM NaCl trong hệ thống Vanquish uHPLC.

Theo một phương án cụ thể, tế bào T, như được định nghĩa ở trên, được cung cấp trong bước a) và protein liên kết kháng nguyên là TCR hoặc đoạn của nó. Theo đó, protein liên kết kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt tế bào T. Do đó, phương pháp này tạo ra tế bào T biểu hiện trên bề mặt của nó protein liên kết kháng nguyên, ví dụ như TCR, đặc hiệu cho các tế bào ung thư như được định nghĩa trong ngữ cảnh của sáng chế.

Các dược phẩm

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm bao gồm protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế hoặc tế bào chủ theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, để sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm theo sáng chế để sử dụng làm thuốc chữa bệnh.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế hoặc/và dược phẩm theo sáng chế, trong sản xuất thuốc chữa bệnh.

Thuật ngữ "dược phẩm" hoặc "chế phẩm trị liệu" như được sử dụng ở đây đề cập đến hợp chất hoặc chế phẩm có khả năng tạo ra hiệu quả trị liệu mong muốn khi được sử dụng đúng cách cho đối tượng.

Theo một số phương án, đối tượng cũng có thể được gọi là bệnh nhân.

Chế phẩm hoặc dược phẩm trị liệu này có thể bao gồm lượng protein liên kết kháng nguyên có hiệu quả trị liệuị theo sáng chế hoặc protein liên kết kháng nguyên còn chứa dược chất trị liệu, trong hỗn hợp với công thức dược dụng hoặc sinh lý được lựa chọn để phù hợp với cách sử dụng.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế thường sẽ được cung cấp như phần của dược phẩm vô trùng, thường sẽ bao gồm chất mang dược dụng.

"Dược" hoặc "dược dụng" dùng để chỉ các thực thể phân tử và chế phẩm không tạo ra phản ứng bất lợi, dị ứng hoặc phản ứng không tốt khác khi dùng cho động vật có vú, đặc biệt là con người, nếu thích hợp. Chất mang hoặc tá dược dược dụng đề cập

đến chất độn rắn, bán rắn hoặc lỏng không độc, chất pha loãng, vật liệu bao gói hoặc chất phụ trợ công thức thuộc bất kỳ loại nào.

"Chất mang dược dụng" cũng có thể được đề cập đến như là "chất pha loãng dược dụng" hoặc "tá dược lỏng dược dụng" và có thể bao gồm dung môi, chất tạo phồng, chất ổn định, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và những chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Theo đó, theo một phương án, chất mang là chất mang nước.

Theo khía cạnh khác, chất mang nước có khả năng mang lại các đặc tính được cải thiện khi kết hợp với protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây, ví dụ, khả năng hòa tan, hiệu quả được cải thiện và/hoặc liệu pháp miễn dịch được cải thiện.

Dạng dược phẩm, đường dùng, liều lượng và phác đồ phụ thuộc một cách tự nhiên vào tình trạng được điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh, tuổi, cân nặng và giới tính của bệnh nhân, thời gian điều trị mong muốn, v.v. Dược phẩm này có thể ở bất kỳ dạng thích hợp nào, (tùy thuộc vào phương pháp sử dụng mong muốn cho bệnh nhân). Nó có thể được cung cấp dưới dạng đơn vị liều lượng, thường được cung cấp trong hộp kín và có thể được cung cấp như phần của kit thử. Kit thử này thông thường (mặc dù không nhất thiết) sẽ bao gồm hướng dẫn sử dụng. Nó có thể bao gồm nhiều dạng liều đơn vị nói trên.

Những cân nhắc theo kinh nghiệm, ví dụ như thời gian bán hủy sinh học, nói chung sẽ góp phần vào việc xác định liều lượng. Tần suất sử dụng có thể được xác định và điều chỉnh trong quá trình trị liệu và dựa trên việc giảm số lượng tế bào ung thư, duy trì sự giảm thiểu tế bào ung thư, giảm sự tăng sinh của tế bào ung thư hoặc tiêu diệt tế bào ung thư. Theo cách khác, các công thức giải phóng liên tục bền vững của protein liên kết kháng nguyên có thể thích hợp. Các công thức và thiết bị khác nhau để đạt được sự giải phóng bền vững đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, liều lượng đối với các protein liên kết kháng nguyên có thể được xác định theo kinh nghiệm ở những cá nhân đã được sử dụng một hoặc nhiều lần sử dụng. Các cá nhân được cung cấp liều lượng tăng dần của protein liên kết kháng nguyên. Để đánh giá hiệu quả của protein liên kết kháng nguyên, có thể theo dõi dấu hiệu của trạng thái tế bào ung thư. Chúng bao gồm các phép đo lường trực tiếp về sự tăng sinh tế bào ung thư và sự chết của tế bào bằng FACS, các kỹ thuật hình ảnh khác;

sự cải thiện về sức khỏe khi được đánh giá bằng các phép đo lường đó, hoặc sự gia tăng chất lượng cuộc sống khi được đo lường bằng các xét nghiệm được chấp nhận hoặc kéo dài thời gian sống sót. Sẽ là rõ ràng đối với những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này là liều lượng sẽ khác nhau tùy thuộc vào từng cá nhân, giai đoạn bệnh, và các phương pháp điều trị trong quá khứ và đồng thời đang được sử dụng.

Cụ thể, dược phẩm chứa các phương tiện dược dụng cho chế phẩm có khả năng được tiêm. Đây có thể là các dung dịch muối đẳng trương, vô trùng, cụ thể (mononatri hoặc dinatri photphat, natri, kali, canxi hoặc magie clorua và các chế phẩm tương tự hoặc hỗn hợp của các muối đó), hoặc các chế phẩm khô, đặc biệt là được sấy thăng hoa mà khi thêm vào, tùy thuộc vào trong trường hợp nước tiệt trùng hoặc nước muối sinh lý, cho phép tạo thành dung dịch tiêm.

Để điều chế dược phẩm, lượng hữu hiệu của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang dược dụng hoặc môi trường nước.

Các dược phẩm thích hợp sử dụng để tiêm gồm các dung dịch nước vô trùng hoặc các thể phân tán; các công thức chứa dầu mè, dầu lạc hoặc propylen glycol nước; và các bột vô trùng để điều chế ngay các dung dịch hoặc thể phân tán tiêm vào vô trùng. Trong tất cả các trường hợp, chế phẩm phải được vô trùng và phải lỏng để có thể dễ dàng kéo dài ống tiêm. Nó phải ổn định dưới các điều kiện sản xuất và lưu trữ và phải được bảo vệ chống lại ảnh hưởng do nhiễm tạp của các vi sinh vật như vi khuẩn và nấm.

Dung dịch của các hợp chất hoạt tính dưới dạng bazơ tự do hoặc muối dược dụng có thể được điều chế trong nước được trộn thích hợp với chất hoạt động bề mặt, ví dụ như hydroxypropylcellulose. Các thể phân tán có thể được điều chế trong glyxerol, polyetylen glycol lỏng, các hỗn hợp của chúng và trong dầu. Dưới các điều kiện lưu trữ và sử dụng thông thường, các sản phẩm điều chế này có thể chứa chất bảo quản để ngăn sự phát triển của các vi sinh vật.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm ở dạng trung tính hoặc dạng muối bằng cách sử dụng các muối dược dụng.

Các dung dịch tiêm vô trùng được điều chế bằng cách kết hợp các hợp chất hoạt tính với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với nhiều thành phần khác nhau

được liệt kê ở trên, theo yêu cầu, theo sau đó bởi cách khử trùng thông qua lọc. Thông thường, các chất phân tán được điều chế bằng cách kết hợp nhiều thành phần hoạt tính được khử trùng khác nhau vào chất mang vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác từ các chất được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế các dung dịch tiêm vô trùng, các phương pháp điều chế được ưu tiên là sấy chân không và sấy thăng hoa tạo ra bột chứa thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn khác bất kỳ từ dung dịch được lọc vô trùng trước của nó.

Việc điều chế các dung dịch đậm đặc hơn, hoặc nồng độ cao, để tiêm trực tiếp cũng được dự tính, trong đó việc sử dụng DMSO làm dung môi được hình dung để dẫn đến sự thâm nhập cực kỳ nhanh chóng, cung cấp nồng độ cao của các chất hoạt tính đến khu vực khối u nhỏ.

Sau khi xây dựng công thức, các giải pháp sẽ được sử dụng theo cách tương thích với công thức liều lượng và với số lượng để có hiệu quả trị liệu. Các công thức này được sử dụng dễ dàng ở nhiều dạng liều lượng khác nhau, ví dụ như loại dung dịch tiêm được mô tả ở trên, nhưng cũng có thể sử dụng viên nang giải phóng thuốc và các loại tương tự.

Phương pháp trị liệu và công dụng

Các tác giả sáng chế đã chỉ ra trong ví dụ 6 của phần thí nghiệm in vitro đối với một số protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, đặc biệt là các phân tử TCER™ theo sáng chế, ví dụ như các phân tử TCER™ hòa tan #114-iso0-UCHT1(17), #114-iso1-UCHT1(17), #114-iso2-UCHT1(17), #114-iso0-BMA031(36), #114-iso1-BMA031(36) và #114-iso2-BMA031(36), hoạt động gây độc tế bào của các phân tử đó đối với các dòng tế bào ung thư dương tính với MAG-003 như Hs695T, A375 và U2OS. Các tác giả sáng chế còn chứng minh rằng hoạt động gây độc tế bào nói trên rất đặc hiệu và giới hạn ở các tế bào dương tính với MAG-003 vì chỉ ly giải biên được tạo ra bởi các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu trong các dòng tế bào biểu hiện HLA-A*02 nhưng không thể hiện peptit MAG-003.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã chứng minh hiệu quả in vivo của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ như TCER™ nhắm đến MAG-003 (SEQ ID NO: 127 và 130, nhóm 3; SEQ ID NO: 135 và 136, nhóm 4), dẫn đến khối u

HS695T ở chuột NOG thuyên giảm hoàn toàn như được mô tả chi tiết trong ví dụ 7 và như trên Fig.11.

Như các tác giả sáng chế đã chứng minh, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế rất hữu ích để tạo ra phản hồi miễn dịch ở chủ thể, tốt hơn là bệnh nhân, trong đó các tế bào khối u có thể bị tiêu diệt bởi phản hồi miễn dịch này. Phản hồi miễn dịch bắt nguồn từ việc tiêm vắc xin trị liệu như vậy có thể được mong đợi là có tính đặc hiệu cao đối với các tế bào khối u vì peptit KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1) không được thể hiện hoặc có mặt quá mức trên các mô bình thường với số lượng bản sao có thể so sánh được, ngăn ngừa nguy cơ không mong muốn phản ứng tự miễn dịch chống lại các tế bào bình thường ở bệnh nhân. Hơn nữa, như được chỉ ra trong phần mở đầu của phần mô tả này, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết cụ thể với KVLEHVVRV, đặc biệt là với các yếu tố quyết định kháng nguyên trong peptit MAG-003 nói trên như được định nghĩa ở đây và do đó, không nhận biết hoặc phản ứng chéo với các kháng nguyên peptit liên quan (các peptit tương tự) có mặt trên mô bình thường thông qua phản ứng chéo. Do đó, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế rất hữu ích cho liệu pháp miễn dịch.

Theo đó, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu, ví dụ như các phân tử TCER™, có thể được sử dụng để điều trị ung thư.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng cho các mục đích trị liệu ở người và/hoặc động vật có vú không phải người, đặc biệt là ở người.

Theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể liên kết với các tế bào khối u và làm giảm sự phát triển và/hoặc tiêu diệt các tế bào khối u thể hiện phức hợp peptit KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1)/MHC trên bề mặt tế bào của chúng. Điều này được hiểu rằng protein liên kết kháng nguyên được sử dụng ở nồng độ thúc đẩy liên kết ở các điều kiện sinh lý (ví dụ, in vivo).

Theo đó, theo một phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng cho liệu pháp miễn dịch chống lại các tế bào khối u của các mô khác nhau như ruột kết, phổi, vú, tuyến tiền liệt, buồng trứng, tuyến tụy, thận, v.v.

Theo phương án khác, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể liên kết và làm giảm sự phát triển và/hoặc tiêu diệt các tế bào khối u.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn tăng sinh bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần lượng protein liên kết kháng nguyên, axit nucleic hoặc vectơ, tế bào chủ hoặc dược phẩm theo sáng chế có hiệu quả trị liệu, như được định nghĩa ở trên trong phần "Protein liên kết kháng nguyên", "Axit nucleic" hoặc "Dược phẩm".

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị chủ thể mắc bệnh tăng sinh bao gồm việc sử dụng các tế bào T nói trên biểu hiện protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế trên bề mặt tế bào.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gây ra phản hồi miễn dịch ở chủ thể mắc bệnh tăng sinh, bao gồm việc sử dụng cho chủ thể này chế phẩm bao gồm các tế bào T biểu hiện cấu trúc nhận biết kháng nguyên theo sáng chế trên bề mặt tế bào.

Theo một phương án, phản hồi miễn dịch được đề cập trong phương pháp này là phản hồi tế bào T gây độc tế bào.

Sáng chế còn đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong chẩn đoán, phòng ngừa và/hoặc điều trị của bệnh tăng sinh.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế để sản xuất thuốc chữa bệnh chẩn đoán, phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh tăng sinh.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên, axit nucleic hoặc vectơ, tế bào chủ hoặc dược phẩm theo sáng chế để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn tăng sinh ở chủ thể.

Theo các phương án được ưu tiên, các tế bào T là tự thân đối với chủ thể hoặc đồng sinh với chủ thể, tốt hơn là tự thân. Tốt hơn là, các tế bào T thu được từ các tế bào lympho thâm nhiễm của khối u hoặc các tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Tốt hơn là, các tế bào T được sử dụng dưới dạng chế phẩm. Theo một phương án có liên quan

được ưu tiên, chế phẩm này còn bao gồm tá dược, trong đó tá dược được định nghĩa ở trên trong phần dược phẩm.

Thuật ngữ "chủ thể" hoặc "cá nhân" được sử dụng thay thế cho nhau và có thể là, ví dụ, con người hoặc động vật có vú không phải con người, tốt hơn là con người.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "chữa" hoặc "điều trị", đề cập đến công dụng trị liệu (tức là, đối với chủ thể mắc bệnh cụ thể) và có nghĩa là đảo ngược, làm giảm bớt, ức chế sự tiến triển của một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn hoặc tình trạng đó. Vì vậy, điều trị không chỉ đề cập đến sự điều trị dẫn đến chữa khỏi hoàn toàn bệnh mà còn là những sự điều trị làm chậm sự tiến triển của bệnh và/hoặc kéo dài thời gian sống cho chủ thể.

"Ngăn ngừa" có nghĩa là công dụng dự phòng (tức là, trên chủ thể dễ mắc bệnh cụ thể).

Theo một phương án, "bệnh" hoặc "rối loạn" là bất kỳ tình trạng nào có thể được lợi từ việc điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo một phương án, điều này bao gồm các rối loạn hoặc bệnh mãn tính và cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh lý có khuynh hướng dẫn đến việc chủ thể mắc chứng rối loạn được đề cập.

Thuật ngữ "cần được điều trị" dùng để chỉ chủ thể đã mắc chứng rối loạn cũng như những chủ thể đã mắc chứng rối loạn này. Theo đó, theo một phương án, chủ thể là bệnh nhân.

"Các bệnh tăng sinh", ví dụ như ung thư, liên quan đến sự tăng sinh không được kiểm soát và/hoặc không thích hợp của các tế bào.

Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn tăng sinh là, ví dụ, bệnh khối u được đặc trưng bởi sự biểu hiện của MAGEA4 và/hoặc MAGEA8, trong tế bào ung thư hoặc khối u của bệnh khối u nói trên.

Theo đó, loại ung thư được ưu tiên cụ thể là ung thư dương tính với MAGEA4 và/hoặc MAGEA8.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, bệnh ung thư được coi là ""dương tính" với MAGEA4 và/hoặc MAGEA8", nếu peptit liên quan, ví dụ như, peptit MAG-003, có mặt trong >98% tất cả các bệnh ung thư theo hướng dẫn của NCI. Trong tất cả các chỉ định khác có tên ở đây, sinh thiết có thể được thực hiện vì đó là tiêu chuẩn trong điều

trị các bệnh ung thư này và peptit có thể được xác định theo XPresident® và các phương pháp liên quan (theo WO 03/100432; WO 2005/076009; WO 2011/128448; WO 2016/107740, US 7.811.828, US 9.791.444 và US 2016/0187351, toàn bộ nội dung của từng tài liệu được đưa vào đây để thao khảo). Theo một phương án, bệnh ung thư có thể dễ dàng được xét nghiệm (tức là, được chẩn đoán), ví dụ, bằng cách sử dụng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Các phương pháp xác định kháng nguyên biểu hiện ung thư sử dụng protein liên kết kháng nguyên được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ "ung thư" và "ung thư biểu bì" không được sử dụng thay thế cho nhau ở đây vì ung thư biểu bì là loại ung thư cụ thể nổi lên ở da hoặc trong các mô lót hoặc bao phủ các cơ quan của cơ thể. Tuy nhiên, các mẫu mô được sử dụng trong Ví dụ 11, được lấy từ các bệnh nhân khối u và các mẫu được phân bổ cho bệnh của bệnh nhân.

Theo một phương án, ung thư mà "dương tính" với MAGEA4 và/hoặc MAGEA8, tức là, thể hiện peptit đích, được lựa chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi, ví dụ như, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư gan, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư tế bào thận, ung thư não, ung thư dạ dày, ung thư đại trực tràng, ung thư tế bào gan, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, ung thư vú, ung thư biểu bì tế bào Merkel, melanoma, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư tử cung, ung thư túi mật và ống mật, u xương và ung thư thực quản.

Theo một phương án, ung thư "dương tính" với MAGEA4 và/hoặc MAGEA8, tức là, thể hiện peptit đích, được lựa chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi, ví dụ như ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư gan, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư dạ dày, ung thư đại trực tràng, ung thư tế bào gan, ung thư tuyến tụy, ung thư vú, melanoma, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư tử cung, ung thư túi mật và ống mật, và ung thư thực quản.

Theo phương án khác, ung thư phổi là ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC), tốt hơn là ung thư tuyến ung thư tế bào phổi không phải tế bào nhỏ hoặc ung thư phổi không phải tế bào nhỏ tế bào vảy (squamous cell non-small cell lung cancer - SNSCLC); hoặc ung thư phổi tế bào nhỏ (small cell lung cancer - SCLC). Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư da, tốt hơn là

melanoma. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư đầu và cổ, tốt hơn là ung thư biểu bì tế bào vảy ở đầu và cổ (head and neck squamous cell carcinoma - HNSCC). Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư gan, tốt hơn là ung thư tế bào gan (hepatocellular cancer - HCC). Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư thực quản, tốt hơn là ung thư chỗ nối dạ dày thực quản.

Trong số các văn bản cung cấp hướng dẫn cho liệu pháp điều trị ung thư là Ung thư, Nguyên tắc và Thực hành Ung thư, Ấn bản thứ 4, (Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4th Edition), DeVita et al, Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1993). Phương pháp trị liệu thích hợp được lựa chọn tùy theo loại ung thư cụ thể và các yếu tố khác như tình trạng chung của bệnh nhân, như được công nhận trong lĩnh vực thích hợp. Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc có thể được thêm vào chế độ trị liệu bằng cách sử dụng các chất chống ung thư khác thường được sử dụng để điều trị bệnh nhân ung thư.

Theo đó, theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với, trước, hoặc sau nhiều loại thuốc và phương pháp điều trị được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư, ví dụ như, chất hóa trị liệu, các chất không hóa trị liệu, chống ung thư tác nhân, và/hoặc bức xạ, tốt hơn là, các chất hóa trị liệu.

"Chẩn đoán" ở đây đề cập đến chẩn đoán y khoa và đề cập đến việc xác định bệnh hoặc tình trạng nào giải thích các triệu chứng và dấu hiệu của người.

"Lượng đạt hiệu quả trị liệu" của protein liên kết kháng nguyên hoặc dược phẩm của nó có nghĩa là lượng protein liên kết kháng nguyên đủ để điều trị bệnh tăng sinh nói trên, với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý áp dụng cho bất kỳ phương pháp điều trị y tế nào. Tuy nhiên, sẽ hiểu rằng tổng lượng sử dụng hàng ngày hoặc hàng tháng của các protein liên kết kháng nguyên, axit nucleic hoặc vectơ, tế bào chủ hoặc dược phẩm theo sáng chế sẽ được quyết định bởi bác sĩ chăm sóc trong phạm vi y tế hợp lý. sự phán xét. Mức độ liều lượng đạt hiệu quả điều trị cụ thể cho bất kỳ bệnh nhân cụ thể nào sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm rối loạn hoặc bệnh đang được điều trị và mức độ nghiêm trọng của rối loạn; hoạt động của protein liên kết kháng nguyên cụ thể được sử dụng; thành phần cụ thể được sử dụng, tuổi, trọng lượng cơ thể, sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn uống của bệnh nhân; thời gian sử dụng, đường dùng và

tốc độ bài tiết của polypeptit cụ thể được sử dụng; thời gian điều trị; thuốc được sử dụng kết hợp hoặc trùng hợp với polypeptit cụ thể được sử dụng; và giống như các yếu tố được biết đến rộng rãi trong các lĩnh vực y tế. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực biết rõ rằng, bắt đầu liều lượng hợp chất ở các mức độ thấp hơn các mức độ cần thiết để đạt được hiệu quả trị liệu mong muốn và tăng dần liều lượng cho đến khi đạt được hiệu quả mong muốn.

Theo một phương án, hiệu quả của phương pháp điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được thử nghiệm in vivo, ví dụ như trên mô hình chuột bị ung thư và bằng cách đo lường, ví dụ, những thay đổi về thể tích khối u giữa các nhóm được điều trị và các nhóm kiểm soát.

Dược phẩm, vectơ, axit nucleic và tế bào theo sáng chế có thể được cung cấp ở dạng gần như tinh khiết, ví dụ, trong đó ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% theo trọng lượng protein liên kết kháng nguyên cùng loại có mặt.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng bất kỳ phương pháp khả thi nào.

Như được bộc lộ ở đây, theo một số phương án, các tế bào chủ, tốt hơn là các tế bào lympho, ví dụ như các tế bào lympho T hoặc các tế bào tiền thân của tế bào lympho T, ví dụ, tế bào T dương tính với CD4 hoặc CD8, tốt nhất là các tế bào T, được sử dụng trong các phương pháp điều trị hoặc các công dụng y tế được mô tả ở đây.

Theo đó, tế bào chủ theo sáng chế, tốt hơn là các tế bào T, có thể được sử dụng làm các thành phần hoạt tính của chế phẩm trị liệu. Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân số lượng tế bào chủ hiệu quả như đã định nghĩa ở trên, tốt hơn là tế bào T. Trong ngữ cảnh của phương pháp này, các tế bào chủ, sau khi được sử dụng cho chủ thể, tốt hơn là tạo ra phản hồi miễn dịch.

Đối với mục đích của các phương pháp theo sáng chế, trong đó các tế bào chủ hoặc các quần thể tế bào được sử dụng cho chủ thể, các tế bào chủ có thể là tế bào dị

sinh (từ chủ thể khác) hoặc tự thân đối với chủ thể. Tốt hơn là, các tế bào là tự thân đối với chủ thể.

Trong trường hợp các tế bào chủ là dị sinh và do đó từ chủ thể khác, chủ thể khác nói trên được cho là khỏe mạnh.

Theo một số phương án, các tế bào T có thể được sản xuất theo các phương pháp được mô tả trong US20190175650, Đơn đăng ký Hoa Kỳ số 16/271.393 và Đơn đăng ký Hoa Kỳ số 16/361.043, nội dung của chúng theo đây được đưa vào toàn bộ để tham khảo.

"Khỏe mạnh" theo sáng chế có nghĩa là đối tượng nói chung có sức khỏe tốt, tốt hơn là có hệ thống miễn dịch tốt và, tốt hơn nữa là, không mắc bất kỳ bệnh nào có thể dễ dàng kiểm tra và phát hiện.

Trong ví dụ cụ thể, tế bào chủ là tế bào T. Theo đó, trong ngữ cảnh của sáng chế, khi tế bào T như được định nghĩa ở trên được sử dụng làm thuốc chữa bệnh, thì thông thường, tế bào T được thu thập từ chủ thể bằng cách phân tách máu. Sau đó, các tế bào T được biến đổi gen để biểu hiện protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế trên bề mặt tế bào của chúng, các tế bào T được biến đổi gen sau đó được mở rộng và sau đó được truyền lại vào chủ thể. Trong ví dụ này, protein liên kết kháng nguyên tốt hơn là TCR.

Theo cách tiếp cận khác, tế bào chủ có thể là tế bào gốc, ví dụ như tế bào gốc trung mô và được thiết kế để biểu hiện protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Trong ví dụ này, protein liên kết kháng nguyên là protein hòa tan như kháng thể, scTCR hoặc protein liên kết kháng nguyên hòa tan như được định nghĩa ở đây, tốt hơn là protein liên kết kháng nguyên hòa tan, nhị đặc hiệu, ví dụ như TCER™ như được mô tả ở đây.

Theo đó, tế bào chủ đã được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nạp bằng axit nucleic và/hoặc vectơ theo sáng chế, như được mô tả ở trên trong phần 'axit nucleic, vectơ và tế bào chủ tái tổ hợp'.

Khi tế bào chủ được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nạp để biểu hiện protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tốt hơn là tế bào này chứa vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện protein liên kết kháng nguyên. Khi tế bào chủ biểu hiện protein liên kết

kháng nguyên theo sáng chế, tế bào chủ sau đó có thể được gọi là tế bào chủ đã hoạt hóa.

Phương thức cho cái gọi là chuyển tiếp nhận tế bào T này đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các đánh giá có thể được tìm thấy trong: Gattioni et al. và Morgan et al. (Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. 6 (2006): 383-393; Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006): 126-129).

Một số phương pháp có thể được sử dụng để tạo ra các tế bào T in vitro. Ví dụ, tế bào lympho thâm nhiễm khối u tự thân có thể được sử dụng trong việc tạo ra CTL. Plebanski et al. (Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol 25 (1995): 1783-1787) đã sử dụng các tế bào lympho máu ngoại vi tự thân (peripheral blood lymphocytes - PLB) để điều chế các tế bào T. Ngoài ra, các tế bào B có thể được sử dụng để sản xuất tế bào T tự thân.

Các tế bào dị sinh cũng có thể được sử dụng trong việc điều chế các tế bào T và phương pháp được mô tả chi tiết trong US6805861, được đưa vào đây để tham khảo.

Theo khía cạnh, phản hồi miễn dịch do TCR kích thích hoặc phản hồi tế bào T có thể đề cập đến sự tăng sinh và kích hoạt các chức năng của cơ quan hiệu ứng được tạo ra bởi liên kết với phức hợp MAG-003/MHC, in vitro hoặc in vivo. Đối với các tế bào T gâyđộc tế bào bị hạn chế MHC lớp I, ví dụ, các chức năng cơ quan hiệu ứng có thể là sự ly giải các tế bào đích được tạo xung peptit, được tạo xung tiền chất peptit, hoặc trình diện peptit tự nhiên, sự tiết ra các cytokine, tốt hơn là Interferon-gamma, TNF-alpha, hoặc IL-2 gây ra bởi peptit, sự tiết ra các phân tử cơ quan hiệu ứng, ví dụ, các granzyme hoặc perforin gây ra bởi peptit, hoặc sự dị ứng.

Như được mô tả ở trên, các tế bào chủ, ví dụ như tế bào T, biểu hiện protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết đặc biệt với phức hợp MAG-003/MHC rất hữu ích trong trị liệu. Do đó, khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các tế bào chủ được hoạt hóa có thể thu được bằng các phương pháp nêu trên theo sáng chế

Các tế bào chủ được hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp trên, có thể nhận biết một cách chọn lọc tế bào đích.

"Tế bào đích" ở đây đề cập đến tế bào thể hiện MAGE-A/MHC như được định nghĩa ở trên trong phần "protein liên kết kháng nguyên".

Theo một phương án, tế bào đích tốt hơn là tế bào ung thư, trong đó bệnh ung thư được định nghĩa ở trên.

In vivo, các tế bào đích cho các tế bào T dương tính với CD8 theo sáng chế có thể là các tế bào của khối u (đôi khi biểu hiện MHC lớp II) và/hoặc các tế bào cơ chất xung quanh khối u (các tế bào khối u) (đôi khi cũng biểu hiện MHC lớp II;) (Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170).

Bộ kit

Cuối cùng, sáng chế cũng đề xuất các bộ kit chứa ít nhất một protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Theo một phương án, bộ kit bao gồm:

a. ít nhất một protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế như được định nghĩa ở trên trong phần "protein liên kết kháng nguyên",

b. vật liệu đóng gói tùy chọn, và

c. tùy chọn, nhãn hoặc tờ hướng dẫn đóng gói có trong vật liệu đóng gói nói trên chỉ ra rằng protein liên kết kháng nguyên đó có hiệu quả để điều trị ung thư hoặc được sử dụng để điều trị ung thư.

Theo phương án có liên quan, ít nhất một protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được chứa trong (các) ống tiêm được làm đầy sẵn đơn và/hoặc đa ngăn (ví dụ, ống tiêm chất lỏng và ống đựng dung dịch).

Theo một phương án, sáng chế bao hàm các bộ kit để sản xuất đơn vị dùng một liều.

Theo đó, theo một phương án, ít nhất một protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế như được đề cập trong a) của kit thử theo sáng chế là protein liên kết kháng nguyên đã được làm khô theo sáng chế được chứa trong vật chứa thứ nhất. Sau đó, kit thử này còn chứa thêm vật chứa thứ hai có chế phẩm dạng nước.

Theo đó, theo một phương án, bộ kit bao gồm:

a. vật chứa thứ nhất chứa ít nhất một protein liên kết kháng nguyên được làm khô theo sáng chế như được định nghĩa ở trên trong phần "Protein liên kết kháng nguyên",

b. vật chứa thứ hai chứa chế phẩm dạng nước;

c. vật liệu đóng gói tùy chọn, và

d. tùy chọn, nhãn hoặc tờ hướng dẫn đóng gói có trong vật liệu đóng gói nói trên cho biết rằng protein liên kết kháng nguyên đó có hiệu quả để điều trị ung thư hoặc được sử dụng trong điều trị ung thư.

Chế phẩm dạng nước thường là dung dịch nước chứa các chất mang dược dụng như được định nghĩa ở trên trong phần "dược phẩm".

Theo phương án có liên quan, "vật chứa thứ nhất" và vật chứa "thứ hai" đề cập đến các ngăn của ống tiêm được làm đầy sẵn nhiều ngăn (ví dụ, các lyosyringe).

Bệnh ung thư được định nghĩa ở trên trong ngữ cảnh của sáng chế.

Trong suốt sáng chế, thuật ngữ "và/hoặc" là kết hợp ngữ pháp được hiểu là bao hàm một hoặc nhiều trường hợp mà nó kết nối có thể xảy ra. Ví dụ, từ ngữ "các protein trình tự nguyên bản này có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp và/hoặc tổng hợp tiêu chuẩn" chỉ ra rằng các protein trình tự nguyên bản có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp và tổng hợp tiêu chuẩn hoặc các protein trình tự nguyên bản có thể được điều chế bằng các phương pháp tái tổ hợp tiêu chuẩn hoặc protein trình tự nguyên bản có thể được điều chế bằng phương pháp tổng hợp.

Hơn nữa, trong toàn bộ sáng chế, thuật ngữ "bao gồm" được hiểu là bao hàm tất cả các tính năng được đề cập cụ thể cũng như các tính năng tùy chọn, bổ sung, không xác định. Như được sử dụng ở đây, việc sử dụng thuật ngữ "bao gồm" cũng bộc lộ phương án trong đó không có đặc điểm nào khác ngoài các đặc điểm được đề cập cụ thể (nghĩa là "chỉ chứa").

Hơn nữa các danh từ chỉ số ít không loại trừ khả năng chỉ số nhiều. Thực tế đơn thuần là các biện pháp nhất định được sử dụng trong các tuyên bố phụ thuộc lẫn nhau không cho thấy rằng sự kết hợp của các biện pháp này không thể được sử dụng để tạo lợi thế.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn cùng với tham khảo các ví dụ sau. Tất cả các tài liệu và tài liệu bằng sáng chế được trích dẫn ở đây đều được kết hợp toàn bộ bằng cách tham khảo. Mặc dù sáng chế đã được minh họa và mô tả chi tiết trong phần mô tả ở trên, nhưng các ví dụ này được coi là để minh họa hoặc làm mẫu và không để hạn chế.

Mô tả các trình tự

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự axit amin
1	MAG-003	KVLEHVVRV
2	Chuỗi alpha TCR R7P1D5 - chiều dài đầy đủ	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREG DSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSN MDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL KVAGFNLLMTLRLWSS
3	peptit dẫn đầu alpha TCR R7P1D5	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR
4	Miền biến đổi alpha R7P1D5	GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYK QEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKH LSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRP
5	R7P1D5 CDRa1	DSSSTY
6	R7P1D5 CDRa2	IFSNMDM
7	R7P1D5 CDRa3	CAEYSSASKIIF
8	R7P1D5 - miền hằng định alpha	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

9	Chuỗi beta TCR R7P1D5 - chiều dài đầy đủ	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMG QEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNN NVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYFCASRANTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
10	peptit dẫn đầu beta TCR R7P1D5	MGSWTLCCVSLCILVAKHT
11	Miền biến đổi beta R7P1D5	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYR QTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPN ASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSR LTVL
12	R7P1D5 CDRb1	SGHDY
13	R7P1D5 CDRb2	FNNNVP
14	R7P1D5 CDRb3	CASRANTGELFF
15	Miền hằng định beta R7P1D5	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSR G

16	Protein dung hợp Aga2p với scTv R7P1D5 và các thẻ	MQLLRCFSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPTLESTPYS LSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTT SKGSPINTQYVFGGGGSDYKDDDDKGGGASGEDVE QSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGA GLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRI ADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTE MGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYF NNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRD SAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVLAAAGGSGGEQ KLISEEDL
17	Trình tự dẫn đầu và Aga2p	MQLLRCFSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPTLESTPYS LSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTT SKGSPINTQYVF
18	Thẻ FLAG cộng với chất kết nối	GGGGSDYKDDDDKGGGAS
19	Các miền biến đổi chuỗi đơn của R7P1D5 với chất kết nối	GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYK QEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKH LSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRH EVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPS EPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
20	Chất kết nối và thẻ Myc	AAAGGSGGEQKLISEEDL
21	đột biến CDRa2 1 (aF57Y)	IYSNMDM

22	scTv R7P1D5S (ổn định)	GEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYK QEPGAGLQLLTYIYSNMDMKQDQRLTVLLNKKDK HLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIR PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPR HEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLE LLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQP SEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
23	RABGAP1L-001	FLLETVVRV
24	AXIN1-001	ILDEHVQRV
25	ANO5-001	IVMEHVVFL
26	TPX2-001	KILEDVVGV
27	SYNE3-001	KLLDLQVRV
28	MIA3-001	KVLDKVFRA
29	HERC4-001	KVLEILHRV
30	PSME2-001	KVLERVNAV
31	HEATR5A-001	KVLETLVTV
32	CNOT1-003	KVLGIVVGV
33	TEP1-003	AVEEHVVSV
34	PITPNM3-001	SVLEKVTRA
35	đột biến CDRa3 1	CAEMTSESKIIF
36	đột biến CDRa3 2	CAEFTSESKIIF
37	đột biến CDRa3 3	CAEFNSESKIIF
38	đột biến CDRa3 4	CAEFSSASKIIF

39	đột biến CDRa3 5	CAEATSESKIIF
40	R7P1D5_aMTSE (R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 1)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREG DSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSN MDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL KVAGFNLLMTLRLWSS
41	R7P1D5_aFTSE (R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 2)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREG DSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSN MDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEFTSESKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL KVAGFNLLMTLRLWSS
42	R7P1D5_aFNSE ((R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 3)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREG DSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSN MDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEFNSESKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL KVAGFNLLMTLRLWSS

43	R7P1D5_aFSSA (R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 4)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREG DSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSN MDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEFSSASKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL KVAGFNLLMTLRLWSS
44	R7P1D5_aATSE (R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREG DSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSN MDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEATSESKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL KVAGFNLLMTLRLWSS
45	NYESO1-001	SLLMWITQV
46	MAG-003_A1	AVLEHVVRV
47	MAG-003_A2	KALEHVVRV
48	MAG-003_A3	KVAEHVVRV
49	MAG-003_A4	KVLAHVVRV
50	MAG-003_A5	KVLEAVVRV
51	MAG-003_A6	KVLEHAVRV
52	MAG-003_A7	KVLEHVARV
53	MAG-003_A8	KVLEHVVAV
54	MAG-003_A9	KVLEHVVRA
55	đột biến CDRa1 1	ESSSTY
56	đột biến CDRa1 2	IYSSQDQ

57	đột biến CDRa1 3	IYSSQDV
58	75-NU(17)-R7P1D5#1 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQ LLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY FCASRANTGELFFGEGSRLTVL
59	đột biến CDRa1 4	IYSSQDS

60	75-NU(17)-R7P1D5#20 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQ LLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFCYGTP CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY FCASRADTGELFFGEGSRLTVL
61	75-NU(17)-R7P1D5#21 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQ LLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGT PCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRADTGELFFGEGSRLTVL
62	đột biến CDRb1 1	PGHDY

63	đột biến CDRb2 1	FCYGHP
64	đột biến CDRb2 2	FCYGVP
65	đột biến CDRb2 3	FCYGTP
66	đột biến CDRb2 4	FCYGAP
67	75-NU(17)-R7P1D5#29 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGPQ LLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFNNNVPI DDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRANTGELFFGEGSRLTVL

68	75-NU(17)-R7P1D5#30 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGPQ LLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFNNNVPI DDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRANTGELFFGEGSRLTVL
69	75-NU(17)-R7P1D5#31 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGKGPQ LLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFNNNVPI DDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRANTGELFFGEGSRLTVL
70	đột biến CDRb2 5	FCYGMP

71	đột biến CDRb3 1 (bN109D)	CASRADTGELFF
72	Đồng thuận CDRa1 - ACT + TCER	X_1SSSTY
73	Đồng thuận CDRa2 - ACT + TCER	IX_1SX_2X_3DX_4
74	đồng thuận CDRa2 p1 - TCER	IYSSQDX1
75	75-NU(17)-R7P1D5#32 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGPQ LLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFNNNVPI DDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASRANTGELFFGEGSRLTVL

76	75-NU(17)-R7P1D5#2 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQ LLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY FCASRANTGELFFGEGSRLTVL
77	đồng thuận CDRa3 ACT + TCER	CAEX$_1$X$_2$SX$_3$SKIIF
78	đồng thuận CDRb1 - ACT + TCER	X$_1$GHDY
79	đồng thuận CDRb2 - ACT + TCER	FX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$P
80	75-NU(17) - R7P1D5x (LC thông thường)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

81	đồng thuận CDRb2 p3 - TCER	FCYGX$_1$P
82	đồng thuận CDRb3 ACT + TCER	CASRAX$_1$TGELFF
83	FR1-a	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT
84	FR2-a	LYWYKQEPGAGLQLLTY
85	FR3-a	KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF
86	FR4-a	GSGTRLSIRP
87	FR1-b	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI
88	FR2-b	LFWYRQTMMRGLELLIY
89	FR3-b	IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF
90	FR4-b	GEGSRLTVL
91	FR1-a (19V)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT
92	FR2-a (48K)	LYWYKQEPGKGLQLLTY
93	FR2-b (54F)	LFWYRQTMMRGLELLFY
94	FR3-b (66C)	CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF
95	MUM-001	KLVEYIVKA
96	chất kết nối được ưu tiên	GGGSGGGG

97	MAGEA4 có thể truy cập được theo số gia nhập Uniprot P43358	MSSEQKSQHCKPEEGVEAQEEALGLVGAQAPTTEE QEAAVSSSSPLVPGTLEEVPAAESA GPPQSPQGASALPTTISFTCWRQPNEGSSSQEEEGPS TSPDAESLFREALSNKVDELAHF LLRKYRAKELVTKAEMLERVIKNYKRCFPVIFGKAS ESLKMIFGIDVKEVDPASNTYTLV TCLGLSYDGLLGNNQIFPKTGLLIIVLGTIAMEGDSA SEEEIWEELGVMGVYDGREHTVY GEPRKLLTQDWVQENYLEYRQVPGSNPARYEFLWG PRALAETSYVKVLEHVVRVNARVRI AYPSLREAALLEEEEGV
98	MAGEA8 có thể truy cập được theo số gia nhập Uniprot P43361	MLLGQKSQRYKAEEGLQAQGEAPGLMDVQIPTAEE QKAASSSSTLIMGTLEEVTDSGSPS PPQSPEGASSSLTVTDSTLWSQSDEGSSSNEEEGPSTS PDPAHLESLFREALDEKVAELV RFLLRKYQIKEPVTKAEMLESVIKNYKNHFPDIFSKA SECMQVIFGIDVKEVDPAGHSYI LVTCLGLSYDGLLGDDQSTPKTGLLIIVLGMILMEGS RAPEEAIWEALSVMGLYDGREHS VYWKLRKLLTQEWVQENYLEYRQAPGSDPVRYEFL WGPRALAETSYVKVLEHVVRVNARV RISYPSLHEEALGEEKGV
99	Chất kết nối	TVAAP
100	Chất kết nối	GGGS
101	Chất kết nối	GGGGS
102	Chất kết nối	TVLRT
103	Chất kết nối	TVSSAS
104	Chất kết nối	GGGGSGGGGS
105	Chất kết nối	GGGGSAAA
106	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGS

107	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS
108	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
109	Chất kết nối	TVLSSAS
110	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
111	trình tự axit amin Fc nguyên bản của IGHG1*01	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
112	Fc với đột biến núm [S354C và T366W]	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
113	Fc với đột biến lỗ [(Y349C, T366S, L368A và Y407V +	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
114	Bản lề IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
115	Bản lề IgG2	ERKCCVECPPCPAPPVAGP
116	Bản lề IgG3	ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPAPE LLG
117	Bản lề IgG4	ESKYGPPCPSCPAPEFLG

118	R7P1D5_aMTSE (R7P1D5 - miền biến đổi alpha var. 1)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
119	R7P1D5_aFTSE (R7P1D5 - miền biến đổi alpha var. 2)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEFTSESKIIFGSGTRLSIRP
120	R7P1D5_aFNSE ((R7P1D5 - miền biến đổi alpha var. 3)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEFNSESKIIFGSGTRLSIRP
121	R7P1D5_aFSSA (R7P1D5 - miền biến đổi alpha var. 4)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEFSSASKIIFGSGTRLSIRP
122	R7P1D5_aATSE (R7P1D5 - miền biến đổi alpha var. 5)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEATSESKIIFGSGTRLSIRP
123	Chuỗi nhẹ 75-NU (V9) cho LC thông thường CR7P1D5S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSNTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

124	75-NU(V9)-CR7P1D5S (HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMN WVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGEDVEQSLF LSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQL LTYIYSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY FCASRANTGELFFGEGSRLTVL
125	75-NU(Var17)-CR7P1D5#19 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQ LLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGT PCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVL

126	75-NU(Var17)-CR7P1D5I (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGGEDVEQSL FLSVREGDSAVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQ LLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFCYGTP CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY FCASRANTGELFFGEGSRLTVL
127	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso0-dsFcKO-GK (alpha-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPG GGSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTK VEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP

128	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#112-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPR HEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLE LLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQ PSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVLEPKSS DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
129	ZFC-001	KLQEQIHRV
130	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPR HEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLE LLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQ PSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVLEPKSS DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP

131	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso1-dsFcKO-GK (alpha-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPG GGSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTK VEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
132	Chuỗi alpha 1G4	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGE NLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQ REQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPDPAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS

133	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso2-dsFcKO-GK (alpha-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPG GGSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTK VEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
134	Chuỗi beta 1G4	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTG QSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTS VYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

135	100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso0-dsFcKO-GK (alpha-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPG GGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY KFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYA EKFQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCA RGSYYDYEGFVYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
136	100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VL-beta)	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQ QKPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKGG GSGGGGDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHD YLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRF SAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELF FGEGSRLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

137	100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso1-dsFcKO-GK (alpha-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPG GGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY KFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYA EKFQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCA RGSYYDYEGFVYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP	
138	R7P1D5#114-iso0-Valpha	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP	

139	100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso2-dsFcKO-GK (alpha-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRPG GGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY KFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYA EKFQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCA RGSYYDYEGFVYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
140	Chất kết nối	GGSGG
141	Chất kết nối	GGSGGGGSGG
142	100(A)-NU(V23)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTEYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPR HEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLE LLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQ PSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVLEPKSS DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP

143	Chất kết nối	GGSGGGGSGGGGSGG
144	Chất kết nối	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
145	Chất kết nối	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
146	Chất kết nối	GSADDAKKDAAKKDGKS
147	Chất kết nối	GGQGSGGTGSGGQGSGGTGSGGQGS
148	Chất kết nối	GGGGSGT
149	R7P1D5#112-Vbeta	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYR QTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPN ASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSR LTVL
150	R7P1D5#114-Vbeta	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYR QTMMRGLELLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPN ASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSR LTVL
151	R7P1D5#114-iso1-Valpha	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
152	R7P1D5#114-iso2-Valpha	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLYWYKQ EPGKGLQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKKDKHLS LRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
153	UCHT1(17) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDIATYFCQQGQTLPWTFGQGTKVEIK
154	UCHT1(17) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSS
155	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGT

156	UCHT1(23) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTEYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSS
157	BMA(10) VL	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQ QKPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK
158	BMA(10) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVT LTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCARGSYYDYD GFVYWGQGTLVTVSS
159	BMA(36) VL	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQ QKPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK
160	BMA(36) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVT LTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCARGSYYDYE GFVYWGQGTLVTVSS
161	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGSGT
162	UCHT1(17opt) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGES DWYFDVWGQGTLVTVSS
163	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT
164	UCHT1(21) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSS
165	Chất kết nối	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGT

166	100(A)-NU(V21)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPR HEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLE LLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQ PSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVLEPKSS DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
167	100(A)-NU(V17opt)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGES DWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGDAGVIQSPR HEVTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLE LLFYFCYGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQ PSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGSRLTVLEPKSS DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
168	PRAME-004	SLLQHLIGL

169	100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (alpha-VL)	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWY RQYSGKSPELIMSIYQEGDKEDGRFTAQLNKASQYV SLLIRDSQPSDSATYLCAAVIDNDQGGILTFGTGTRL TIIPNIQNGGGSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLP WTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
170	100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGKAGVTQTP RYLIKTRGQQVTLSCSPIPGHRAVSWYQQTPGQGLQ FLFEYVHGEERNKGNFPGRFSGRQFSNSSSEMNISNL ELGDSALYLCASSPWDSPNVQYFGPGTRLTVTEDLK NEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
171	INTS4-002	KLLDLMPRL
172	SAMH-001	KLLSYIQRL
173	PPP1CA-006	SIIGRLLEV

174	RPL-007	KIYEGQVEV
175	SETD1A-001	ILLEHNYAL
176	NOMAP-1-0320	ALSNLEVKL
177	NOMAP-1-1223	LLDVPTAAV
178	ODC-001	ILDQKINEV
179	COL6A3-010	KLLPYIVGV
180	FAM115A-001	KLGSVPVTV
181	PHTF2-001	KLFGHLTSA
182	RPP1-001	KTLSAILRI

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ Fig.1 đến Fig.18 biểu thị các phương án như được mô tả ở đây.

Fig.1 thể hiện các kết quả từ việc chuyển đổi TCR thành scTCR ổn định thông qua màn hình bề mặt nấm men. Các phân tử ScTCR được hiển thị trên bề mặt của nấm men Saccharomyces cerevisiae EBY100 được biến nạp được nhuộm bằng kháng thể chống lại Vbeta8 được dán nhãn FITC và tetrame HLA-A*02/MAG-003 được dán nhãn PE. ScTCR R7P1D5 không sửa đổi (bảng bên trái, SEQ ID NO: 19) được so sánh với biến thể scTCR mang hai đột biến điểm đơn ổn định (bảng bên phải, SEQ ID NO: 22), được dẫ xuất từ sự lựa chọn thư viện scTCR đột biến ngẫu nhiên. Có thể thấy rằng biến thể scTCR mang hai đột biến điểm đơn ổn định thể hiện khả năng nhuộm tetrame HLA-A*02/MAG-003 tăng lên.

Fig.2A thể hiện các kết quả từ hiển thị bề mặt nấm men cho sự bão hòa độ bám dính scTCR của CDR3 alpha. ScTCR ổn định bao gồm CDR3 alpha không biến đổi và bão hòa được nhuộm bằng các monome HLA-A*02/MAG-003 ở nồng độ 15 nM. Chống thấm bằng hỗn hợp 10 tetrame HLA-A*02, mỗi tetrame được áp dụng ở nồng độ 10 nM, chứa các peptit (SEQ ID NO: 23 đến 32) có độ tương tự trình tự cao như MAG-003 (SEQ ID NO: 1). ScTCR ổn định (SEQ ID NO: 22) với trình tự CDR3 chuỗi alpha không sửa đổi CAEYSSASKIIF (SEQ ID NO: 7) được so sánh với các biến thể scTCR bao gồm trình tự CDR3 chuỗi alpha bão hòa độ bám dính

CAEFSSASKIIF (SEQ ID NO: 38), CAEMTSESKIIF (SEQ ID NO: 35), CAEFTSESKIIF (SEQ ID NO: 36), CAEFNSESKIIF (SEQ ID NO: 37) và CAEATSESKIIF (SEQ ID NO: 39), tương ứng. Có thể thấy rằng nhân bản nấm men có các CDR đột biến alpha 2 (SEQ ID NO: 56, 57, 59), beta 1 (SEQ ID NO: 62) hoặc beta 2 (SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 70) cũng thể hiện sự liên kết được cải thiện mạnh mẽ trong khi tính đặc hiệu cho HLA-A*02/MAG-003 chủ yếu được giữ lại.

Fig.2B thể hiện các kết quả từ hiển thị bề mặt nấm men cho sự bão hòa độ bám dính scTCR của CDR2 alpha, CDR3 alpha, CDR1 beta và CDR2 beta, tương ứng. ScTCR ổn định bao gồm các CDR không biến đổi và bão hòa được nhuộm bằng monome HLA-A*02/MAG-003 (monome pHLA đích) và được phản nhuộm với hỗn hợp 10 tetrame HLA-A*02, mỗi tetrame được áp dụng ở nồng độ 10 nM, chứa các peptit (SEQ ID NO: 23 đến 32) có độ tương tự trình tự cao như MAG-003 (SEQ ID NO: 1). (a) So sánh các biến thể scTCR với các trình tự không sửa đổi (SEQ ID NO: 6) và chuỗi alpha bão hòa CDR2 IYSSQDQ (SEQ ID 56), IYSSQDV (SEQ ID 57) và IYSSQDS (SEQ ID 59), mỗi loại được nhuộm với monome HLA-A*02/MAG-003 40 nM. (b) So sánh các biến thể scTCR với trình tự không sửa đổi (SEQ ID NO: 7) và trình tự CDR3 chuỗi alpha bão hòa CAEFSSASKIIF (SEQ ID NO: 38), CAEMTSESKIIF (SEQ ID NO: 35), CAEFTSESKIIF (SEQ ID NO: 36), CAEFNSESKIIF (SEQ ID NO: 37) và CAEATSESKIIF (SEQ ID NO: 39), mỗi loại được nhuộm với monome HLA-A*02/MAG-003 15 nM. (c) So sánh các biến thể scTCR không sửa đổi (SEQ ID NO: 12) và trình tự CDR1 chuỗi beta bão hòa PGHDY (SEQ ID NO: 62), mỗi loại được nhuộm với monome HLA-A*02/MAG-003 40 nM. (d) So sánh các biến thể scTCR với trình tự không sửa đổi (SEQ ID NO: 13) và các trình tự CDR2 chuỗi beta bão hòa FCYGHP (SEQ ID NO: 63), FCYGVP (SEQ ID NO: 64), FCYGTP (SEQ ID NO: 65) , FCYGAP (SEQ ID NO: 66), FCYGMP (SEQ ID NO: 70), mỗi loại được nhuộm với monome HLA-A*02/MAG-003 5 nM. Nhuộm với các tetrame HLA-A*02/MAG-003 được tăng lên đáng kể đối với tất cả các đột biến CDRa3 R7P1D5 khi so sánh với TCR mẹ R7P1D5, thể hiện sự liên kết peptit-HLA được cải thiện của các biến thể đột biến.

Fig.3 thể hiện quá trình nhuộm biến thể TCR R7P1D5 bão hòa biểu hiện tế bào T CD8+ của người với tetrame HLA-A*02/MAG-003 được dán nhãn PE và kháng thể

kháng Vbeta 8 được dán nhãn FITC. Với mục đích kiểm soát, không có TCR (MOCK) hoặc TCR 1G4 đặc hiệu cho NYESO1-001 được biểu hiện và việc nhuộm bằng tetrame HLA-A*02/NYESO1-001 được dán nhãn PE đã được sử dụng.

Fig.4 thể hiện sự giải phóng IFN-gamma của biến thể TCR R7P1D5 bão hòa biểu hiện các tế bào T CD8+ của người để phản hồi với MAG-003. Với mục đích kiểm soát, không có TCR (MOCK) hoặc TCR 1G4 đặc hiệu cho NYESO1-001 được biểu hiện. Sự giải phóng IFN-gamma được xác định bằng ELISA sau khi đồng nuôi cấy các tế bào T CD8+ được mạ điện với các tế bào T2 được tải với dung dịch pha loãng nối tiếp MAG-003. Các mức cơ bản của IFN-gamma (do các tế bào T CD8+ được mạ điện MOCK giải phóng khi đồng nuôi cấy với các tế bào T2 được tải tương ứng) được trừ đi. So với TCR R7P1D5 mẹ, các đột biến CDRa3 R7P1D5 bão hòa 1-5 thể hiện sự giải phóng IFN-gamma tăng lên phản hồi với MAG-003.

Fig.5 thể hiện sự giải phóng IFN-gamma của biến thể TCR R7P1D5 bão hòa biểu hiện các tế bào T CD8+ của người phản hồi với MAG-003 và các peptit tương tự khác nhau. Với mục đích kiểm soát, không có TCR (MOCK) hoặc TCR 1G4 đặc hiệu cho NYESO1-001 được biểu hiện. Sự giải phóng IFN-gamma được xác định bằng ELISA sau khi đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ được mạ điện với các tế bào T2 được tải với 10 μM peptit. Các mức cơ bản của IFN-gamma (do các tế bào T CD8+ được mạ điện MOCK giải phóng khi đồng nuôi cấy với các tế bào T2 được tải tương ứng) được trừ đi. So với TCR R7P1D5 mẹ, đột biến CDRa3 R7P1D5 bão hòa 1-5 thể hiện sự gia tăng giải phóng IFN-gamma phản hồi với MAG-003 và không giải phóng IFN-gamma cho các peptit tương tự được thử nghiệm.

Fig.6 thể hiện sự giải phóng IFN-gamma của biến thể TCR R7P1D5 bão hòa biểu hiện tế bào T CD8+ của người phản hồi với MAG-003 và các peptit thay thế alanin tương ứng. Với mục đích kiểm soát, không có TCR (MOCK) hoặc TCR 1G4 đặc hiệu cho NYESO1-001 được biểu hiện. Sự giải phóng IFN-gamma được xác định bằng ELISA sau khi đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ được mạ điện với các tế bào T2 được tải với 10 μM peptit. Các mức cơ bản của IFN-gamma (do các tế bào T CD8+ được mạ điện MOCK giải phóng khi đồng nuôi cấy với các tế bào T2 được tải tương ứng) được trừ đi.

Fig.7A thể hiện năng suất sản xuất và dữ liệu ổn định ứng suất nhiệt của các protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab hòa tan bao gồm các miền biến đổi TCR với các CDR bão hòa độ bám dính khác nhau và/hoặc các đột biến khung.

Fig.7B thể hiện các đường cong liên kết của các protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab hòa tan S, #1, #2 và I với MAG-003 trong phức hợp với HLA-A*02 được đo lường bằng phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học. Nồng độ tăng dần của monome HLA-A*02/MAG-003 trong dung dịch được sử dụng cho mỗi phép đo lường tương tác và được tính bằng nM.

Fig.7C thể hiện các đường cong liên kết của các protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab hòa tan I (các đường cong màu xám) và #19 (các đường cong màu đen) đối với MAG-003 và các peptit ngoài mục tiêu được dẫn xuất từ mô bình thường SYNE3-001, TPX2-001, PSME2-001, tương ứng, trong phức hợp với HLA-A*02. Phép đo lường giao thoa lớp sinh học được sử dụng để đo lường và nồng độ 1 μM scTCR-Fab trong dung dịch đã được áp dụng.

Fig.8A thể hiện năng suất sản xuất và dữ liệu về độ ổn định ứng suất nhiệt của các protein liên kết kháng nguyên TCER™ hòa tan bao gồm các vùng biến đổi TCR với các CDR bão hòa độ bám dính được chọn kết hợp với các trình tự VH/VL khác nhau của kháng thể thu nhận tế bào T được nhân hóa BMA031(36) cũng như các biến thể khác nhau 17, 17opt, 21, 23 của kháng thể thu nạp tế bào T được nhân hóa UCHT1.

Fig.8B thể hiện các đường cong liên kết của các protein liên kết kháng nguyên TCER™ bao gồm các biến thể miền biến đổi TCR 114-iso0, 114-iso1 và 114-iso2 kết hợp với UCHT1(17) và BMA031(36) cho MAG-003 trong phức hợp với HLA-A*02. Phép đo lường giao thoa lớp sinh học được sử dụng để đo lường và nồng độ ngày càng tăng của các phân tử TCER™ trong dung dịch đã được áp dụng và được tính bằng nM.

Fig.8C thể hiện các đường cong liên kết của các phân tử TCER™114-iso1-BMA(36) và 114-iso2-UCHT1(17) cho MAG-003 và các peptit ngoài mục tiêu được dẫn xuất từ mô bình thường NOMAP-1-0320, NOMAP-1-1223, ODC-001, tương ứng, trong phức hợp với HLA-A*02 được ổn định bằng disulfua. Phép đo lường giao thoa lớp sinh học được sử dụng để đo lường và nồng độ 1 μM TCER™ trong dung dịch đã được áp dụng.

Fig.9 thể hiện dữ liệu hiệu quả in vitro của việc tiêu diệt thông qua trung gian TCER™ của các dòng tế bào khối u dương tính với HLA-A*02 với biểu hiện MAG-003 có thể phát hiện (Hs695T và A375) và không có biểu hiện MAG-003 có thể phát hiện (BV173). Các phân tử TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể UCHT1(17) với các miền biến đổi của các biến thể TCR #114-iso0 (SEQ ID NO: 127 và 130), #114-iso1 (SEQ ID NO: 131 và 130) và #114-iso2 (SEQ ID NO: 133 và 130) đã được thử nghiệm (bảng trên). Hơn nữa, các phân tử TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể BMA031(36) với các miền biến đổi của các biến thể TCR #114-iso0 (SEQ ID NO: 135 và 136) và #114-iso2 (SEQ ID NO: 139 và 136) đã được thử nghiệm (bảng dưới). Các tế bào khối u được đồng ủ với PBMC của người từ người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh (HBC-720) theo tỷ lệ 1:10 và hoạt động gây độc tế bào khi tăng nồng độ phân tử TCER™ được phân tích bằng xét nghiệm giải phóng LDH. Sau 48 giờ, sự ly giải của các dòng tế bào đích được đo lường bằng cách sử dụng các kit thử xét nghiệm độc tế bào không phóng xạ CytoTox 96 (PROMEGA). Quá trình ly giải tế bào hiệu quả được thể hiện đối với các phân tử TCER™ bao gồm các kháng thể UCHT1(17) và BMA031(36).

Fig.10 thể hiện việc tiêu diệt in vitro thông qua trung gian TCER™ củacác dòng tế bào khối u dương tính với HLA-A*02 với biểu hiện MAG-003 có thể phát hiện được bằng TCER™ (Hs695T, A375 và U2OS). Các phân tử TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể UCHT1(17) với các miền biến đổi của các biến thể TCR #114-iso1 (SEQ ID NO: 131 và 130) và #114-iso2 (SEQ ID NO: 133 và 130) cũng như các phân tử TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể BMA031(36) với các miền biến đổi của biến thể TCR #114-iso1 (SEQ ID NO: 137 và 136) đã được thử nghiệm. Các tế bào khối u được đồng ủ với PBMC của người từ người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh (HBC-982) theo tỷ lệ 1:10 và hoạt động gây độc tế bào khi nồng độ phân tử TCER™ ngày càng tăng được phân tích bằng xét nghiệm giải phóng LDH. Sau 48 giờ, sự ly giải của các dòng tế bào khối u được đo lường bằng cách sử dụng các kit thử gây độc tế bào không phóng xạ CytoTox 96 (PROMEGA). Sự ly giải tế bào khối u hiệu quả được thể hiện đối với các phân tử TCER™ bao gồm các kháng thể UCHT1(17) và BMA031(36).

Fig.11 thể hiện hiệu quả in vivo thông qua trung gian TCER™ ở những con chuột NOG thiếu miễn dịch, được khắc PBMC của người chống lại các bản sao khối u của các tế bào Hs695T, dòng tế bào khối u dương tính với HLA-A*02 với sự thể hiện có thể phát hiện của MAG-003 (SEQ ID NO: 1) và PRAME-004 (SEQ ID NO: 168). TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể UCHT1(17) với các miền biến đổi của biến thể TCR #114-iso0 (SEQ ID NO: 127 và 130, nhóm 3) được so sánh với TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể BMA03(36) với các miền biến đổi của biến thể TCR #114-iso0 (SEQ ID NO: 135 và 136, nhóm 4). Để kiểm soát, TCER nhắm tới PRAME-004 (SEQ ID NO: 169 và 170, nhóm 2) đã được sử dụng. Nhóm 1 đại diện cho nhóm kiểm soát được điều trị bằng phương tiện, trong đó một con vật đã bị hy sinh do khối u bị loét ở ngày thứ 11. Mỗi biểu tượng được nối bằng đường thẳng đại diện cho một con vật riêng lẻ và ngày điều trị được biểu thị bằng mũi tên. Sự thuyên giảm hoàn toàn được thể hiện đối với TCER™ bao gồm kháng thể UCHT1(17) và kháng thể BMA03(36) để thu nạp tế bào T.

Fig.12 thể hiện dữ liệu an toàn in vitro cho phân tử TCER™ 114-iso1-BMA(36) (SEQ ID NO: 137 và 136) như được đánh giá trong các thí nghiệm tiêu diệt LDH với 11 tế bào sơ cấp mô bình thường dương tính với HLA-A*02 của người từ các cơ quan khác nhau. Các tế bào khác nhau được đồng nuôi cấy với các tế bào hiệu ứng PBMC từ những người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh theo tỷ lệ 1:10 và nồng độ TCER™ tăng. Các tế bào được đồng ủ trong hỗn hợp 50% của môi trường đặc hiệu tế bào mô sơ cấp và môi trường tế bào T. Để xác định cửa sổ an toàn, các phân tử TCER™ đã được đồng ủ trong thiết lập giống hệt với dòng tế bào khối u MAG-003 dương tính với Hs695T. Cửa sổ an toàn được xác định dựa trên mức ảnh hưởng quan sát được thấp nhất (lowest observed effect level - LOEL) được xác định là nồng độ TCER™ đầu tiên thể hiện phản hồi trên giá trị giới hạn. Giới hạn được xác định là ([độ lệch chuẩn so với tất cả các bản sao ba x 3] + mẫu mô bình thường kiểm soát không có TCER) và được biểu thị dưới dạng đường chấm trong mỗi biểu đồ độc tế bào. Đối với mỗi loại tế bào mô bình thường, cửa sổ an toàn được xác định dựa trên LOEL lớn hơn 1.000 lần hoặc 10.000 lần thể hiện tiêu diệt có lợi của phân tử 114-iso1-BMA (36) TCER™.

Fig.13 thể hiện hiệu quả in vivo trung gian bởi TCER™ trên chuột NOG thiếu miễn dịch được khắc PBMC của người chống lại các bản sao khối u của các tế bào

Hs695T, dòng tế bào khối u dương tính với HLA-A*02 với sự thể hiện có thể phát hiện của MAG-003 (SEQ ID NO: 1). Các phân tử TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể UCHT1(V17opt) và các miền biến đổi của biến thể TCR 114-iso1 (SEQ ID NO: 131 và 167, nhóm 3) đã được so sánh với TCER™ bao gồm các miền biến đổi kháng thể BMA03(36) với các miền biến đổi của biến thể TCR 114-iso1 (SEQ ID NO: 137 và 136, nhóm 2). Nhóm 1 đại diện cho nhóm kiểm soát được xử lý bằng phương tiện. Biểu đồ thể hiện khối lượng khối u trung bình thu được từ sáu (nhóm 2 và 3) đến mười chuột (phương tiện) mỗi nhóm. Sự thuyên giảm hoàn toàn được thể hiện đối với các phân tử TCER™ bao gồm kháng thể UCHT1(17opt) và kháng thể BMA03(36) để thu nạp tế bào T khi dùng liều iv mỗi tuần một lần là 0,01 mg/kg thể trọng.

Fig.14 thể hiện tiểu sự dược động học của phân tử 114-iso1-UCHT1(17) TCER™ ở chuột NOG. Chuột được tiêm một liều duy nhất vào tĩnh mạch với liều lượng 2 mg/kg thể trọng. Nồng độ huyết tương TCER™ của các mẫu được thu thập tại các thời điểm khác nhau được xác định bằng ELISA phát hiện sự hiện diện của các miền protein cụ thể (xét nghiệm F_c – V_L) hoặc hoạt tính liên kết nhị đặc hiệu (xét nghiệm CD3 - pMHC).

Fig.15 thể hiện thiết kế của các phân tử TCER™. Các thụ thể tham gia tế bào T nhị đặc hiệu (TCER™) là các protein dung hợp chứa các miền biến đổi (Vα, Vβ) của TCR bão hòa độ bám dính và các miền biến đổi (V_H, V_L) của kháng thể thu nạp tế bào T được nhân hóa. Các phân tử sử dụng phần F_c làm im lặng chức năng hiệu ứng, mang lại thời gian bán hủy kéo dài và cả các đặc tính ổn định/khả năng sản xuất được cải thiện.

Fig.16 thể hiện dữ liệu an toàn in vitro cho phân tử TCER™ 114-iso1-BMA(36) (SEQ ID NO: 137 và 136) được đánh giá trong các thí nghiệm tiêu diệt LDH với 12 tế bào sơ cấp mô bình thường dương tính với HLA-A*02 của người từ các cơ quan khác nhau. Các tế bào khác nhau được đồng nuôi cấy với các tế bào hiệu ứng PBMC từ những người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh theo tỷ lệ 1:10 và nồng độ TCER™ tăng. Các tế bào được đồng ủ trong hỗn hợp 50% của môi trường đặc hiệu tế bào mô sơ cấp và môi trường tế bào T. Để xác định cửa sổ an toàn, các phân tử TCER™ đã được đồng ủ trong thiết lập giống hệt với dòng tế bào khối u MAG-003 dương tính với Hs695T. Cửa sổ an toàn được xác định dựa trên mức ảnh hưởng quan sát được thấp

nhất (LOEL) được xác định là nồng độ TCER™ đầu tiên thể hiện phản hồi trên giá trị giới hạn. Giới hạn được xác định là ([độ lệch chuẩn so với tất cả các bản sao ba x 3] + mẫu mô bình thường đối chứng không có TCER) và được biểu thị dưới dạng đường chấm trong mỗi biểu đồ độc tế bào. Đối với mỗi loại tế bào mô bình thường, cửa sổ an toàn được xác định dựa trên LOEL lớn hơn 1.000 lần hoặc 10.000 lần thể hiện cửa sổ an toàn có lợi của phân tử 114-iso1-BMA(36) TCER™.

Fig.17 thể hiện độc tế bào và sự giải phóng IFN-gamma của biến thể TCR R7P1D5 bão hòa biểu hiện các tế bào T CD8+ của người để phản hồi với các dòng tế bào khối u thể hiện số lượng bản sao khác nhau của HLA-A*02/MAG-003. Với mục đích kiểm soát, không có TCR (MOCK) hoặc TCR 1G4 đặc hiệu cho NYESO1-001 được biểu hiện. Mức LDH và IFN-gamma trong các phần nổi được xác định sau khi đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ được mạ điện với các dòng tế bào khối u.

Fig.18 thể hiện việc các mô bình thường và các mẫu khối u được phân tích để thể hiện peptit đã được phân nhóm theo cơ quan xuất xứ của chúng. Phần trên: các cường độ tín hiệu MS trung bình từ các phép đo lường lặp lại kỹ thuật và các phép đo lường ước tính được vẽ biểu đồ dưới dạng các dấu chấm cho các mẫu bình thường dương tính HLA-A*02 lẻ (phần bên trái của hình) và mẫu khối u (phần bên phải của hình) mà peptit được phát hiện trên đó. Biểu đồ hình hộp và râu biểu thị cường độ tín hiệu chuẩn hóa trên nhiều mẫu và đã được xác định trong không gian nhật ký. Các hộp hiển thị phân vị trung bình, thứ 25 và 75. Râu kéo dài đến điểm dữ liệu thấp nhất vẫn nằm trong 1,5 độ trải giữa (interquartile range – IQR) của điểm tứ phân vị dưới, và điểm dữ liệu cao nhất vẫn nằm trong 1,5 IQR của điểm tứ phân vị trên. Phần dưới: tần số phát hiện peptit tương ứng trong mọi cơ quan có thể được hiển thị dưới dạng biểu đồ cột sống. Các con số bên dưới bảng cho biết số lượng mẫu mà peptit được phát hiện, trên tổng số mẫu có thể đánh giá cho phân tích cho từng cơ quan (N = 581 đối với các mẫu bình thường, N = 771 đối với các mẫu khối u). Nếu peptit đã được phát hiện trên mẫu nhưng không thể định lượng được vì các lý do kỹ thuật, mẫu được đưa vào sự biểu diễn tần số phát hiện này, nhưng không có dấu chấm nào được biểu thị ở phần trên của hình.

Các từ viết tắt được sử dụng: adipose: mô mỡ; adrenal gl: tuyến thượng thận; bladder: bàng quang tiết niệu; bloodvess: mạch máu; esoph: thực quản; gall bl: túi mật;

intest. la: ruột già; intest. sm: ruột non; nerve cent: dây thần kinh trung ương; nerve perith: dây thần kinh phúc mạc; parathyr: tuyến cận giáp; perit: phúc mạc; pituit: tuyến yên; skel. mus: cơ xương; AML: bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính; BRCA: ung thư vú; CCC: ung thư biểu mô đường mật; CLL: bệnh bạch cầu lymphocytic mãn tính; CRC: ung thư đại trực tràng; GBC: ung thư túi mật; GBM: u nguyên bào đệm; GC: ung thư dạ dày; GEJC: ung thư điểm nối dạ dày-thực quản; HCC: ung thư biểu mô tế bào gan; HNSCC: ung thư biểu mô tế bào vảy ở đầu và cổ; MEL: melanoma (u ác tính); NHL: U lympho không Hodgkin; NSCLCadeno: ung thư biểu mô tuyến ung thư phổi không phải tế bào nhỏ; NSCLCother: các mẫu NSCLC không thể được chỉ định rõ ràng cho NSCLCadeno hoặc NSCLCsquam; NSCLCsquam: ung thư phổi không phải tế bào nhỏ tế bào vảy; OC: ung thư buồng trứng; OSCAR: ung thư thực quản; PACA: ung thư tuyến tụy; PRCA: ung thư tuyến tiền liệt; RCC: ung thư biểu mô tế bào thận; SCLC: ung thư phổi tế bào nhỏ; UBC: ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu; UEC: ung thư tử cung và nội mạc tử cung.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thụ thể tế bào T (các TCR) chống lại các kháng nguyên ung thư thường có độ bám dính thấp hơn khi so sánh với các TCR nhắm đến các kháng nguyên virus, và đây có thể là lời giải thích khả thi cho sự thoát khỏi hệ miễn dịch của khối u (Aleksic et al. 2012, Eur J Immunol. 2012 tháng 12; 42(12): 3174-9). Do đó, mong muốn là tạo ra các biến thể TCR có độ bám dính cao hơn để sử dụng làm các cấu trúc nhắm đến kháng nguyên ung thư trong liệu pháp tế bào được áp dụng, hoặc làm môđun nhận biết của thuốc trị liệu hòa tan, tức là, các phân tử nhị đặc hiệu (Hickman et al. 2016, J Biomol Screen. 2016 Tháng 9; 21(8): 769-85). Do đó, sáng chế liên quan đến sự sửa đổi và tối ưu hóa thụ thể tế bào T R7P1D5, được xác định từ danh mục TCR tự nhiên của người dựa trên ái lực và tính chọn lọc cao đối với peptit liên quan đến khối u MAG-003 (SEQ ID NO: 1). TCR R7P1D5 bao gồm miền biến đổi alpha với trình tự axit amin SEQ ID NO: 4 và miền biến đổi beta với trình tự axit amin SEQ ID NO: 11, được công bố trong WO 2017/158103.

Ví dụ 1: Tạo ra scTCR ổn định

Đối với sáng chế, TCR R7P1D5 (SEQ ID NO: 2 và 9, chiều dài đầy đủ) được chuyển đổi thành cấu trúc TCR chuỗi đơn (scTCR R7P1D5, SEQ ID NO: 19) bằng

cách sử dụng các miền biến đổi alpha (SEQ ID NO: 4) và beta (SEQ ID NO: 11) và trình tự liên kết glycine-serin thích hợp. Đối với sự bão hòa của TCR thông qua hiển thị bề mặt nấm men, DNA của trình tự tương ứng được tổng hợp và biến đổi thành Saccharomyces cerevisiae EBY100 (MATa AGA1::GAL1¬AGA1::URA3 ura3¬52 trp1 leu2¬delta200 his3¬delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (ATCC® MYA¬4941™) cùng với vectơ hiển thị nấm men có chứa trình tự dẫn đầu và protein giao phối nấm men Aga2p (SEQ ID NO: 19), dựa trên pCT302 (Boder và Wittrup, Phương pháp Enzymol. 2000;328:430-44;). Protein dung hợp kết quả sau khi tái tổ hợp tương đồng trong nấm men (SEQ ID NO: 16) chứa peptit dẫn đầu ở đầu phần cuối N của protein Aga2p, chịu trách nhiệm hiển thị protein được quan tâm (Boder và Wittrup, Nat Biotechnol. 1997 Jun;15(6):553-7), các thẻ peptit ngắn bao gồm các trình tự trình tự liên kết (SEQ ID NO: 18 và 20) cho các kiểm soát biểu hiện và protein được quan tâm, cụ thể là scTCR R7P1D5 (SEQ ID NO: 19) hoặc các biến thể của nó. Các thư viện các biến thể scTCR được tạo ra thông qua cách tiếp cận PCR đột biến ngẫu nhiên bao gồm toàn bộ trình tự gen của scTCR R7P1D5. Sự biến nạp của các tế bào nấm men được thực hiện như được mô tả trong WO 2018/091396 và dẫn đến lên đến 10^9 nhân bản nấm men trên mỗi thư viện.

Quá trình chọn lọc các nhân bản nấm men mang các biến thể scTCR đột biến với sự liên kết được cải thiện với MAG-003 trong ngữ cảnh của HLA-A*02 về cơ bản được thực hiện như được mô tả trong Smith et al. (Phương pháp Mol Biol. 2015;1319:95-141). Để xác định sự biểu hiện cao và cấu trúc chính xác của các biến thể R7P1D5 scTCR hiển thị trên bề mặt nấm men, nhuộm với kháng thể chống lại Vbeta8 (Life Technology, clone 1C1) đã được sử dụng, cùng với nhuộm tetrame HLA-A*02/MAG-003 (Fig.1). Sự chuyển đổi scTCR bằng cách hiển thị bề mặt nấm men thể hiện hai đột biến ổn định quan trọng để thể hiện thích hợp scTCR trên bề mặt tế bào, một trong vùng khung FR1-a (SEQ ID NO: 83) của chuỗi alpha scTCR và một trong CDR2 của chuỗi alpha (SEQ ID NO: 6), dẫn đến phiên bản ổn định scTCR R7P1D5S (SEQ ID NO: 22) thể hiện liên kết tetrame HLA-A*02/MAG-003 được cải thiện.

Ví dụ 2: Bão hòa độ bám dính của scTCR ổn định

Để tạo ra các phân tử scTCR có độ bám dính liên kết cao hơn đối với HLA-A*02/MAG-003, tất cả các CDR được bão hòa riêng lẻ, sử dụng scTCR R7P1D5S ổn

định đã được xác định trước đó (SEQ ID NO: 22). Các phần còn lại CDR được ngẫu nhiên hóa bằng cách sử dụng mồi oligo DNA thoái hóa về cơ bản như đã mô tả trước đây (Smith et al., Phương pháp Mol Biol. 2015;1319: 95-141). Các thư viện DNA kết quả được biến nạp như được mô tả trong ví dụ 1. Để bảo toàn tính đặc hiệu liên kết, sự chọn lọc âm tính được sử dụng dựa trên hỗn hợp các tetrame HLA A*02 bao gồm các peptit được dẫn xuất từ mô bình thường (SEQ ID NO: 23 đến 32) thể hiện mức độ tương tự cao của trình tự với peptit MAG-003 (SEQ ID NO: 1).

Để lựa chọn các biến thể scTCR R7P1D5S chọn lọc và nâng cao độ bám dính, nồng độ giảm dần của tetrame hoặc monome HLA-A*02/MAG-003 đã được sử dụng cho mỗi vòng lựa chọn. Sau ba vòng lựa chọn, các nhân bản scTCR đơn lẻ được phân lập và giải trình tự, dẫn đến các trình tự CDR bão hòa độ bám dính khác nhau. Như được thể hiện một cách ví dụ cho scTCR với các trình tự CDRa3 bão hòa (SEQ ID NO: 35 đến 39), sự cải thiện mạnh mẽ về liên kết monome HLA-A*02/MAG-003 có thể được chứng minh. Tính chọn lọc của liên kết HLA-A*02/MAG-003 được duy trì như đã được xác nhận bởi tính liên kết thấp với hỗn hợp 10 tetrame HLA-A*02 chứa các peptit được dẫn xuất từ mô bình thường với mức độ tương tự cao của trình tự với peptit MAG-003 (SEQ ID NO: 1). Đột biến CDRa3 5 (SEQ ID NO: 39) thể hiện liên kết chéo tăng nhẹ của HLA-A*02/các peptit tương tự tetrame (Fig.2A). Ngoài ra, các dòng nấm men có các CDR đột biến alpha 2 (SEQ ID NO: 56, 57, 59), beta 1 (SEQ ID NO: 62) hoặc beta 2 (SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 70) thể hiện sự liên kết được cải thiện mạnh mẽ trong khi tính đặc hiệu cho HLA-A*02/MAG-003 chủ yếu được giữ lại (Fig.2B).

Ví dụ 3: Sử dụng TCR đã bão hòa để biểu hiện tế bào

Sự sửa đổi tế bào T để biểu hiện các TCR nhận biết peptit-MHC đặc hiệu cho khối u là chiến lược đầy hứa hẹn trong việc chuyển hướng các tế bào T tới các tế bào ung thư. Việc sử dụng các trình tự CDR3 bão hòa có thể cải thiện khả năng phản ứng của các TCR liên kết tế bào chống lại HLA-A*02/MAG-003 và các trình tự đột biến CDRa3 đã xác định (SEQ ID NO: 35 đến 39) được ghép vào chuỗi alpha TCR R7P1D5 mẹ (SEQ ID NO: 2) và được kết hợp với chuỗi beta TCR R7P1D5 mẹ (SEQ ID NO: 9). Các biến thể TCR đột biến thu được (đột biến R7P1D5 CDRa3 1-5 bao gồm các trình tự biến thể chuỗi alpha SEQ ID NO: 40 đến 44, tương ứng) được biểu

hiện trong các tế bào T CD8+ của người sau khi điện phân mRNA tương ứng được tạo ra bằng cách phiên mã in vitro của cấu trúc DNA được khuếch đại PCR. Với mục đích kiểm soát, 1G4 TCR (SEQ ID NO: 132 và 134) được biểu hiện, được hướng đến peptit NYESO1-001 (SEQ ID NO: 45) trong phức hợp với HLA-A*02. Sau khi ủ qua đêm các tế bào T CD8+ được điện phân RNA, sự biểu hiện của các biến thể TCR được đưa vào được phân tích bằng cách nhuộm với các tetrame peptit-HLA-A*02 được dán nhãn PE và kháng thể chống lại Vbeta 8 được dán nhãn FITC. TCR R7P1D5 mẹ và tất cả các biến thể được dẫn xuất từ chúng thể hiện khả năng nhuộm chống lại Vbeta 8 tương tự khi được so sánh với các mức nền từ mẫu được giả điện phân và kiểm soát TCR NYESO1 âm tính với Vbeta 8, lập luận cho hiệu quả biểu hiện tương tự. Ngược lại, nhuộm với tetrame HLA-A*02/MAG-003 tăng đáng kể đối với tất cả các đột biến R7P1D5 CDRa3 khi được so sánh với TCR R7P1D5 mẹ (Fig.3), thể hiện sự liên kết peptit-HLA được cải thiện của các biến thể đột biến. Sự hoạt hóa chức năng của các tế bào T CD8+ (20.000 tế bào/giếng) biểu hiện các biến thể TCR R7P1D5 khác nhau được khảo sát bằng cách đo lường sự giải phóng IFN-gamma qua trung gian tế bào T để phản hồi các tế bào đích T2 (20.000 tế bào/giếng) được tải bằng loạt MAG-003 pha loãng (Fig.4) hoặc 10 µM MAG-003 và các peptit tiềm năng ngoài mục tiêu (Fig.5). Các peptit ngoài mục tiêu tiềm năng được chọn từ cơ sở dữ liệu của các peptit liên kết HLA-A*02 được thểh hiện ở mô bình thường (cơ sở dữ liệu XPRESIDENT) dựa trên sự tương đồng cao về trình tự (tìm kiếm BLAST tương đồng) với MAG-003. So với TCR R7P1D5 mẹ, các đột biến R7P1D5 CDRa3 bão hòa 1-5 thể hiện khả năng phản ứng tăng lên (Fig.4) như được chỉ ra bởi nồng độ thấp hơn từ 3 đến 9 lần (các giá trị EC_{50}, Bảng 3) cần thiết để gây ra giải phóng IFN-gamma nửa cực đại. Như dự kiến, chỉ quan sát thấy giải phóng IFN-gamma nền với các tế bào T không biểu hiện TCR bổ sung (MOCK) hoặc TCR kiểm soát 1G4 đặc hiệu cho NYESO1-001. Để phân tích tính chọn lọc của nhận biết MAG-003 của các biến thể R7P1D5 TCR bão hòa, giải phóng IFN-gamma phản hồi các tế bào T2 được tải với các peptit tương tự khác nhau (SEQ ID NO: 23 đến 34) đã được phân tích. Dữ liệu đã được hiệu chỉnh cho sự giải phóng IFN-gamma nền bằng cách trừ đi các mức IFN-gamma được giải phóng bởi các tế bào CD8+ T được giả mạ điện khi đồng nuôi cấy với các tế bào T2 được tải tương ứng. Ngoại trừ đột biến R7P1D5 CDRa3 5 thể hiện tín hiệu tăng nhẹ đối với một số peptit

tương tự và tín hiệu thấp của đột biến R7P1D5 CDRa3 2 chống lại MIA3-001, tất cả các biến thể R7P1D5 TCR bão hòa khác đều có tính chọn lọc cao mà không có phản ứng chéo đối với các peptit tương tự được thử nghiệm (Fig.5). Vì tất cả các biến thể đột biến TCR gây ra giải phóng IFN-gamma cụ thể MAG-003 cao hơn đáng kể so với TCR mẹ, các đột biến R7P1D5 CDRa3 4, 1 và 3 (và có khả năng là 2) là những ứng cử viên hứa hẹn nhất cho việc nhắm đến khối u dựa trên TCR tế bào. Các đột biến 1-5 R7P1D5 CDRa3 1-5 còn được đặc trưng đối với các yếu tố quyết định kháng nguyên liên kết của chúng bởi phân tích đột biến. Các đột biến R7P1D5 CDRa3 1-4 thể hiện yếu tố quyết định kháng nguyên liên kết rộng với sự nhận biết nghiêm ngặt của các vị trí 1, 5, 7, và 8 như là các thay thế alanin tại các vị trí này bãi bỏ phản hồi. Đối với một số biến thể R7P1D5, ví dụ như đột biến 1, hiệu ứng nhẹ cũng được quan sát thấy đối với thay thế alanin ở vị trí 3. Phù hợp với tính đặc hiệu thấp hơn của nó được thể hiện với các peptit tương tự, TCR đột biến R7P1D5 CDRa3 5 đã nhận biết các vị trí 7 và 8 với mức độ nghiêm ngặt giảm khi so với các biến thể đột biến 1-4 (Fig.6). Hoạt động chức năng của các biến thể TCR đột biến CDRa3 được đánh giá thêm trên các dòng tế bào khối u có số lượng bản sao khác nhau của HLA-A*02/MAG-003. Tế bào T CD8+ được điện phân RNA được đồng nuôi cấy với các dòng tế bào khối u với tỷ lệ hiệu ứng-mục tiêu là 3: 1 (NCI-H1755, MCF-7: 25.000 tế bào/giếng; Hs695T, A375, U2O: 12.500 tế bào/giếng). Sự biểu hiện của các biến thể TCR được đưa vào trong các tế bào T CD8+ đã được xác minh như được mô tả ở trên. Sau khi đồng nuôi cấy các tế bào hiệu ứng và đích trong 24 giờ, các mức LDH và IFN-gamma được giải phóng vào các chất nổi đã được định lượng. Các mức LDH được xác định bằng các kit thử xét nghiệm độc tế bào không phóng xạ CytoTox 96 (PROMEGA) và độc tế bào được tính theo tỷ lệ phần trăm của tổng số kiểm soát ly giải sau khi trừ đi sự giải phóng LDH tự phát của tế bào hiệu ứng và tế bào đích. Tất cả các biến thể TCR đột biến CDRa3 gây ra khả năng tiêu diệt tất cả các dòng tế bào khối u được phân tích mạnh hơn so với TCR mẹ, trong khi không quan sát thấy sự tiêu diệt nào đối với các tế bào MCF-7 âm tính với mục tiêu. Đối với các dòng tế bào khối u có số lượng bản sao đích thấp hơn (A375, U2OS), chỉ có độc tế bào tối thiểu được tìm thấy đối với TCR kiểu hình chuẩn, trong khi đặc biệt là các biến thể bão hòa 1-4 có thể gây ra sự tiêu diệt đáng kể, điều này thể hiện rằng các biến thể này sẽ cho phép điều trị quần thể bệnh nhân có số lượng

bản sao mục tiêu thấp. Phù hợp với dữ liệu về độc tế bào, cũng quan sát thấy sự giải phóng IFN-gamma tăng cường đối với các tế bào T biểu hiện các biến thể TCR bão hòa so với kiểu hình chẩn.

Bảng 3: Nồng độ giải phóng IFN-gamma nửa cực đại [nM] của các biến thể đột biến R7P1D5 và CDRa3 1-5 mẹ. TCR R7P1D5 mẹ dựa trên SEQ ID NO: 2 và 11 và các TCR biến thể đột biến 1-5 dựa trên SEQ ID NO: 40 đến 44, tương ứng, và SEQ ID NO: 11.

Biến thể	**EC_{50} [nM]**
R7P1D5	9,5
Đột biến R7P1D5 CDRa3 4	1,4
Đột biến R7P1D5 CDRa3 1	2,1
Đột biến R7P1D5 CDRa3 2	1,4
Đột biến R7P1D5 CDRa3 3	1,1
Đột biến R7P1D5 CDRa3 5	3,7

Ví dụ 4: Sản xuất, tinh chế và xác định đặc tính của các biến thể scTCR

Các TCR bao gồm các miền Valpha và Vbeta được thiết kế, sản xuất và thử nghiệm ở định dạng chuỗi đơn (scTCR) kết hợp với đoạn Fab được dẫn xuất từ kháng thể thu nạp tế bào T đặc hiệu cho CD3 được nhân hóa UCHT1. Do đó, các plasmid có chứa các chuỗi nhẹ của các kháng thể UCHT1 được nhân hóa (SEQ ID No: 123 cho biến thể S và SEQ ID No: 80 cho các biến thể khác ngoại trừ S) hoặc các trình tự scTCR tương ứng được kết hợp với phần cuối C của V_H-C_{H1} của kháng thể UCHT1 được nhân hóa, được kiểm soát bởi các thành phần thúc đẩy được dẫn xuất từ HCMV, đã được tạo ra.

Bảng 4: Sự kết hợp của các trình tự để tạo ra các biến thể scTCR được biểu hiện cùng với đoạn Fab. Đối với chuyển nạp các plasmid chứa trình tự chuỗi nhẹ được trộn với các plasmid chứa trình tự chuỗi nặng Fab tương ứng.

Biến thể	**Chuỗi nhẹ (SEQ ID No:)**	**Chuỗi nặng (SEQ ID No:)**
S	123	124
I	80	126
#1	80	58

#2	80	76
#19	80	125
#20	80	60
#21	80	61
#29	80	67
#30	80	68
#31	80	69
#32	80	75

DNA plasmid được khuếch đại ở E. coli theo các phương pháp nuôi cấy tiêu chuẩn và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng các kit thử bán sẵn trên thị trường (Macherey & Nagel). DNA plasmid tinh khiết được sử dụng để truyền nhất thời các tế bào CHO-S theo hướng dẫn của nhà sản xuất (hệ thống ExpiCHO™; Thermo Fisher Scientific). Tế bào CHO được chuyển nạp được nuôi cấy 10-12 ngày ở nhiệt độ 32°C đến 37°C và nhận được một lần cấp liệu ExpiCHO™ Feed.

Phần nổi của tế bào được điều hòa được làm sạch bằng cách lọc (0,22 µm) sử dụng Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu được tinh chế bằng cách sử dụng hệ thống Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences) được trang bị để thực hiện sắc ký độ bám dính và loại trừ kích thước theo dòng. Sắc ký độ bám dính được thực hiện trên các cột protein L (GE Lifesciences) theo các quy trình sắc ký độ bám dính tiêu chuẩn. Sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện trực tiếp sau khi rửa giải bằng axit (pH 2,8) từ cột độ bám dính để thu được protein monome tinh khiết cao bằng cách sử dụng các cột Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) theo các quy trình chuẩn. Nồng độ protein được xác định trên hệ thống NanoDrop (Thermo Scientific) bằng cách sử dụng các hệ số tắt được tính toán theo trình tự protein được dự đoán. Nồng độ được điều chỉnh, nếu cần, bằng cách sử dụng thiết bị Vivaspin (Sartorius). Cuối cùng, các phân tử tinh khiết được lưu trữ trong nước muối đệm phosphat (DPBS, pH 7,2) ở nồng độ khoảng 1 mg/mL ở nhiệt độ 2-8°C. Năng suất của mỗi phân tử được đánh giá bằng cách tính năng suất là [miligam protein tinh khiết/lít chất nổi tế bào].

Chất lượng của protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab tinh khiết được xác định bằng HPLC-SEC trên các cột MabPac SEC-1 (5 µm, 7,8x300 mm) chạy trong 50

mM natri-phosphat pH 6,8 chứa 300 mM NaCl trong Hệ thống Vanquish uHPLC-System. Bước sóng của máy dò được thiết lập là 214 nm. Sử dụng cùng phương pháp luận, các mẫu ứng suất nhiệt của các phân tử tương ứng (sau khi bảo quản trong 7 hoặc 14 ngày ở 40°C trong DPBS ở 1 mg/mL) được phân tích. Cốt liệu cảm ứng được tính là [% cốt liệu (sau khi ứng suất)] - [% cốt liệu (bắt đầu)]. Độ phục hồi monome được tính bằng [diện tích đỉnh monome (sau khi ứng suất)] / [diện tích đỉnh monome (bắt đầu)] x 100%. Như được thể hiện trên Fig.7A, sự khác biệt rõ rệt về năng suất sản xuất (bảng bên trái) và độ ổn định ứng suất nhiệt đã được quan sát thấy giữa các biến thể scTCR khác nhau. Biến thể scTCR ổn định S (SEQ ID No: 124) chứa các trình tự CDR kiểu hình chuẩn kết hợp với hai đột biến khung (aS19A, aF57Y) chỉ có thể được biểu hiện ở các mức thấp. các mức độ biểu hiện tăng và độ ổn định ứng suất nhiệt tăng có thể đạt được sau khi kết hợp các trình tự CDRa2, CDRa3 và CDRb1 bão hòa độ bám dính (biến thể #1) và các trình tự CDRa2, CDRa3 và CDRb1 bão hòa độ bám dính cùng với trình tự CDRb2 bão hòa độ bám dính kết hợp với đột biến khung liền kề bI66C (biến thể I). Sử dụng cả hai biến thể scTCR bão hòa CDR, I và #1, các sửa đổi thêm của các vùng khung đã được thử nghiệm để cải thiện năng suất biểu hiện và độ ổn định ứng suất nhiệt. Việc kết hợp 3 đột biến khung (aL50P, bM46P và bM47G) vào biến thể #1 tạo ra biến thể #30 với năng suất sản xuất tăng, mà có thể được cải thiện hơn nữa bằng cách thay thế đột biến khung aS19A thành aS19V (biến thể #32). Tác động của đột biến aS19A hoặc aS19V được làm nổi bật bởi biến thể #29 đại diện cho biến thể #32 với đột biến ngược aS19, mà dẫn đến năng suất giảm mạnh và mức độ tổng hợp tăng cao. Đáng chú ý, tác động tiêu cực thứ hai được nêu của đột biến ngược aS19 đối với năng suất sản xuất có thể được đảo ngược bằng cách đưa vào đột biến khung aA48K (biến thể #31). Trong ngữ cảnh của biến thể scTCR bão hòa CDR I, đột biến khung bổ sung bI54F (biến thể #19) và đột biến bN109D trong chuỗi beta CDR3 (biến thể #20) đã được thử nghiệm một mình hoặc kết hợp (biến thể #21). Đột biến bN109D trong CDRb3 đã chuyển đổi mô-típ NT, mà có khả năng dễ bị khử độc tố của gốc Asn, thành mô-típ DT, mà có thể có lợi về mặt cách tiếp cận thiết kế để loại bỏ các nguy cơ trình tự trong các trình tự CDR. Việc đưa đột biến khung bI54F vào biến thể I (biến thể #19) dẫn đến năng suất được cải thiện và độ ổn định ứng suất nhiệt được cải thiện của scTCR. Việc đưa thêm đột biến CDRb3 bN109D vào biến thể #19 đã tạo ra

biến thể scTCR #21 với khả năng ổn định ứng suất nhiệt được cải thiện mạnh mẽ hơn mặc dù chỉ đột biến bN109D (biến thể #20) chỉ thể hiện năng suất được cải thiện một chút và độ ổn định tương tự khi so sánh với biến thể I.

Các protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab được phân tích về độ bám dính liên kết của chúng đối với peptit kháng nguyên MAGE-A của SEQ ID NO: 1 trong phức hợp với HLA-A*02 thông qua phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học. Các phép đo lường được thực hiện trên hệ thống Octet RED384 sử dụng các thiết lập do nhà sản xuất khuyến nghị. Tóm lại, động học liên kết được đo lường ở 30°C và tốc độ lắc 1000 vòng/phút sử dụng PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA làm chất đệm. Các phân tử nhị đặc hiệu được tải vào các cảm biến sinh học (FAB2G) trước khi phân tích các dung dịch pha loãng nối tiếp của phức hợp peptit-HLA-A*02. Protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu bao gồm biến thể scTCR ổn định S (SEQ ID NOs: 123 và 124) chỉ thể hiện các tín hiệu liên kết rất yếu ở nồng độ 500 nM (Fig.7B, Bảng 5). Việc đưa vào các trình tự CDRa2, CDRa3 và CDRb1 không bão hòa độ bám dính (biến thể #1 và biến thể #2) cải thiện mạnh mẽ liên kết đối với peptit-MHC đích. Các giá trị K_D 2-3 nM được xác định cho các biến thể #1 (SEQ ID NOs: 80, 58) và #2 (SEQ ID NOs: 80, 76). Việc bao gồm thêm trình tự CDRb2 bão hòa cùng với đột biến khung bI66C vào biến thể scTCR #2 đã dẫn đến cải thiện hơn nữa độ bám dính liên kết với K_D đo lường được là 150 pM cho biến thể I (SEQ ID NOs: 80, 126).

Bảng 5: Các đột biến khung, các kết hợp CDR và các giá trị K_D của các biến thể S (SEQ ID NO: 123, 124), #1, #2 và I (SEQ ID NO: 80 kết hợp với 58, 76 hoặc 126, tương ứng). Giá trị K_D được đo lường bằng phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học.

Biến thể TCR	CDRa1	CDRa2	CDRa3	CDRb1	CDRb2	CDRb3	K_D [M]
S aS19A	DSSSTY SEQ ID NO: 5	IYSNMDM SEQ ID NO: 21	CAEYSSASKIIF SEQ ID	SGHDY SEQ ID NO: 12	FNNNVP SEQ ID NO: 13	CASRANTGELFF SEQ ID	-*

			NO: 7			NO: 14	
#1 aS19A	DSSSTY SEQ ID NO: 5	IYSSQ DQ SEQ ID NO: 56	CAEMT SESKII F SEQ ID NO: 35	PGHDY SEQ ID NO: 62	FNNN VP SEQ ID NO: 13	CASRA NTGEL FF SEQ ID NO: 14	2.35E-09
#2 aS19A	DSSSTY SEQ ID NO: 5	IYSSQ DS SEQ ID NO: 59	CAEMT SESKII F SEQ ID NO: 35	PGHDY SEQ ID NO: 62	FNNN VP SEQ ID NO: 13	CASRA NTGEL FF SEQ ID NO: 14	2.69E-09
I aS19A bI66C	DSSSTY SEQ ID NO: 5	IYSSQ DS SEQ ID NO: 59	CAEMT SESKII F SEQ ID NO: 35	PGHDY SEQ ID NO: 62	FCYGT P SEQ ID NO: 65	CASRA NTGEL FF SEQ ID NO: 14	1.53E-10

*không có tín hiệu liên kết liên quan lên đến 500 nM

Các protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab còn được đặc trưng về tính đặc hiệu của chúng bằng cách phân tích liên kết với các peptit ngoài mục tiêu tiềm năng trong phức hợp với HLA-A*02. Các peptit ngoài mục tiêu tiềm năng được chọn từ cơ sở dữ liệu của các peptit liên kết HLA-A*02 được thể hiện ở mô bình thường (cơ sở dữ liệu XPRESIDENT) dựa trên sự tương đồng trình tự được xác định bằng tìm kiếm BLAST tương đồng. Sự liên kết được phân tích thông qua phép đo lường giao thoa lớp sinh học về cơ bản như được mô tả ở trên. Các tín hiệu liên kết của tất cả các tương tác được xác định ở nồng độ 1 µM scTCR-Fab nhị đặc hiệu bằng cách sử dụng các cảm biến sinh học HIS1K để tải các phức hợp peptit-HLA-A*02. Các peptit ngoài mục tiêu tiềm năng được phân tích về phản hồi liên kết của chúng ở cuối giai đoạn liên kết. So với biến thể scTCR I (SEQ ID NO: 80, 126), biến thể #19 (SEQ ID NO: 80, 125) bao gồm đột biến khung bổ sung bI54F thể hiện tính đặc hiệu liên kết được cải thiện (Fig.7C, Bảng 6) bên cạnh năng suất sản xuất và ổn định được cải thiện như được trình

bày ở trên. Trong khi các đường cong liên kết cho MAG-003 (SEQ ID NO: 1) tương tự nhau đối với cả hai biến thể (Fig.7C), biến thể #19 thể hiện liên kết bị thay thế với các peptit ngoài mục tiêu SYNE3-001 (SEQ ID NO: 27), TPX2-001 (SEQ ID NO: 26) và PSME2-001 (SEQ ID NO: 30) như được thể hiện bởi sự thiếu tín hiệu ràng buộc (Bảng 6).

Bảng 6: Tính đặc hiệu của các protein liên kết kháng nguyên scTCR-Fab với biến thể scTCR I (SEQ ID NO: 80, 126) và biến thể #19 (SEQ ID NO: 80, 125). Động học liên kết của 1 μM nhị đặc hiệu được đo lường bằng phép đo lường giao thoa lớp sinh học. Các phản hồi ở cuối giai đoạn kết hợp (tính bằng nm hoặc theo% của tín hiệu MAG-003) được thể hiện.

	I		#19	
ID mẫu tải	Phản hồi	Phản hồi (% of MAG-003)	Phản hồi	Phản hồi (% of MAG-003)
MAG-003	0,738	100,0	0,719	100,0
SYNE3-001	0,226	30,6	-0,006	-0,9
TPX2-001	0,136	18,4	-0,003	-0,3
PSME2-001	0,074	10,0	-0,010	-1,4

Ví dụ 5: Sản xuất, tinh chế và xác định đặc tính của các phân tử TCER™ nhị đặc hiệu

Fig.15 thể hiện phân tử TCER™ nhị đặc hiệu phù hợp với một phương án của sáng chế. Các thụ thể tham gia tế bào T nhị đặc hiệu (TCER™) là các protein dung hợp có chứa các miền biến đổi (Vα, Vβ) của TCR bão hòa độ bám dính và các miền biến đổi (VH, VL) của kháng thể thu nạp tế bào T được nhân hóa. Các phân tử sử dụng phần Fc làm im lặng chức năng hiệu ứng, mang lại thời gian bán hủy kéo dài và cả các đặc tính ổn định/khả năng sản xuất được cải thiện.

Các phân tử TCER™ nhị đặc hiệu được thiết kế dựa trên các miền biến đổi chuỗi TCR alpha và beta đã chọn với CDR và đột biến khung được ưu tiên, như được mô tả trong ví dụ 4. Các miền biến đổi TCR tương ứng của biến thể scTCR #21 được kết hợp với các đột biến khung có lợi aS19V và aA48K dẫn đến biến thể TCR #114-iso0 (SEQ ID NO: 138 và SEQ ID NO: 150). Để tối ưu hóa hơn nữa trình tự miền biến đổi

của TCR #114-iso0, hai vị trí đồng phân hóa tiềm năng (các mô-típ DS) nằm trong CDRa1 (aD27E) và CDRa2 (aS65Q), tương ứng, được thay thế dẫn đến các biến thể TCR #114-iso1 (SEQ ID NO: 151 và SEQ ID NO: 150) và 114-iso2 (SEQ ID NO: 152 và SEQ ID NO: 150) có một hoặc không có, tương ứng, trình tự đồng thuận sửa đổi sau dịch trong các CDR. Các miền biến đổi được mô tả ở trên của các biến thể TCR #114-iso0, #114-iso1 và #114-iso2 được kết hợp với các miền VL và VH được dẫn xuất từ các biến thể được dẫn xuất từ hai kháng thể thu nạp tế bào T mới được nhân hóa BMA03(36) (SEQ ID NO: 159 và 160), UCHT1(17) (SEQ ID NO: 153 và 154) và các biến thể UCHT1(17) khác nhau UCHT1(17opt) (SEQ ID No: 153 và 162), UCHT1 (21) (SEQ ID No: 153 và 164) và UCHT1 (23) (SEQ ID No: 153 và 156), tương ứng.

Sử dụng định dạng TCR/kháng thể diabody-F_c, đã thiết kế các phân tử TCER™ (các trình tự có độ dài đầy đủ ví dụ được thể hiện trong Bảng 7) và các vectơ tương ứng với mono-cistronic, được kiểm soát bởi các thành phần thúc đẩy được dẫn xuất từ HCMV, các dẫn xuất pUC19. DNA plasmid được khuếch đại ở E.coli theo các phương pháp nuôi cấy tiêu chuẩn và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng các kit thử bán sẵn trên thị trường (Macherey & Nagel). DNA plasmid tinh khiết đã được sử dụng để chuyển nạp nhất thời các tế bào CHO-S bằng cách sử dụng hệ thống kết hợp điện (MaxCyte STX). Tế bào CHO được chuyển nạp được nuôi cấy 10-12 ngày ở nhiệt độ 32°C đến 37°C và nhận một đến ba lần tiếp liệu dung dịch Cellboost 7a và 7b (GE Healthcare™).

Bảng 7: Sự kết hợp giữa các trình tự miền biến đổi TCR và các trình tự miền biến đổi kháng thể thu nhận tế bào T để tạo ra các biến thể tương ứng của phân tử TCER™. Đối với chuyển nạp plasmid chứa chuỗi A và plasmid chứa chuỗi B được trộn lẫn.

Phân tử TCER™	**Chuỗi A SEQ ID No:**	**Chuỗi B SEQ ID No:**
114-iso0-UCHT1(17)	127	130
114-iso1-UCHT1(17)	131	130
114-iso2-UCHT1(17)	133	130
114-iso0-BMA(36)	135	136
114-iso1-BMA(36)	137	136

114-iso2-BMA(36)	139	136

Phần nổi tế bào được điều hòa được làm sạch bằng cách lọc (0,22 µm) sử dụng Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu được tinh chế bằng cách sử dụng hệ thống Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences) được trang bị để thực hiện sắc ký độ bám dính và loại trừ kích thước theo dòng. Sắc ký độ bám dính được thực hiện trên MAbSelect SuRE hoặc các cột protein L (GE Lifesciences) theo các quy trình sắc ký độ bám dính tiêu chuẩn. Sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện trực tiếp sau khi rửa giải (pH 2,8) từ cột độ bám dính để thu được protein đơn phân tinh khiết cao bằng cách sử dụng các cột Superdex 200 pg 26/600 (GE Lifesciences) theo quy trình chuẩn. Nồng độ protein được xác định trên hệ thống NanoDrop (Thermo Scientific) bằng cách sử dụng hệ số tắt được tính toán theo trình tự protein được dự đoán. Nồng độ được điều chỉnh, nếu cần, bằng cách sử dụng thiết bị Vivaspin (Sartorius). Cuối cùng, các phân tử tinh khiết được bảo quản trong dung dịch muối đệm phosphat ở nồng độ khoảng 1 mg/mL ở nhiệt độ 2-8°C.

Chất lượng của các protein liên kết kháng nguyên nhị đặc hiệu tinh khiết được xác định bằng HPLC-SEC trên các cột MabPac SEC-1 (5 µm, 4x300 mm) chạy trong 50 mM natri-phosphat pH 6,8 chứa 300 mM NaCl trong Hệ thống Vanquish uHPLC-System. Bước sóng của máy dò được thiết lập là 214 nm. Cốt liệu cảm ứng được tính là [% cốt liệu (sau khi ứng suất)] - [% cốt liệu (bắt đầu)]. Độ phục hồi monome được tính bằng [diện tích đỉnh monome (sau khi ứng suất)] / [diện tích đỉnh monome (bắt đầu)] x 100%.

Dữ liệu về năng suất và độ ổn định ứng suất của các phân tử TCER™ khác nhau được thể hiện trên Fig.8A. Tất cả các biến thể, ngoại trừ biến thể 114-iso1-UCHT1 (17opt), thể hiện năng suất sản xuất hơn 10 mg/l (Fig.8, bảng bên trái). Thử nghiệm ứng suất nhiệt của các phân tử ở 40°C thể hiện độ ổn định rất tốt đến mức chấp nhận được đối với tất cả các phân tử TCER™ được sản xuất thể hiện sự hình thành tổng hợp ít hơn 10% sau 14 ngày ứng suất nhiệt (Fig.8A, bảng bên phải).

Sử dụng phép đo lường giao thoa lớp sinh học, các protein liên kết kháng nguyên TCER™ nhị đặc hiệu bao gồm các biến thể TCR 114-iso0, 114-iso1 và 114-iso2 kết hợp với UCHT1(17) và BMA03(36), tương ứng (như được trình bày trong Bảng 7), được đặc trưng cho độ bám dính liên kết đối với peptit kháng nguyên MAGE-A (SEQ

ID NO: 1) trong phức hợp với HLA-A*02 (Fig.8A, Bảng 8). Các phép đo lường được thực hiện trên hệ thống Octet RED384 sử dụng các thiết lập do nhà sản xuất khuyến nghị. Tóm lại, động học liên kết được đo lường ở 30°C và tốc độ lắc 1000 vòng/phút bằng cách sử dụng PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA làm đệm. Các phức hợp peptit-HLA-A*02 được tải vào các cảm biến sinh học (HIS1K) trước khi phân tích các dung dịch pha loãng nối tiếp của các phân tử TCER™ nhị đặc hiệu. Các biến thể TCER™ 114-iso0, 114-iso1 và 114-iso2 liên kết chặt chẽ với MAG-003 phức hợp với HLA-A*02 với các giá trị K_D tương ứng là 1,8 nM, 2,0 nM và 2,3 nM, thể hiện rằng liên kết HLA-A*02/MAG-003 không bị ảnh hưởng bởi việc loại bỏ hai vị trí đồng phân hóa trong CDRa1 (aD27E) và CDRa2 (aS65Q) của miền alpha biến đổi TCR.

Bảng 8: Phân tích độ bám dính của các biến thể TCER™ 114-iso0, 114-iso1 và 114-iso2 kết hợp với UCHT1(17) và BMA03(36) như trong Bảng 7. Các giá trị K_D được đo lường bằng phép đo lường giao thoa lớp sinh học.

	UCHT1(17)			**BMA031(36)**		
	114-iso0	**114-iso1**	**114-iso2**	**114-iso0**	**114-iso1**	**114-iso2**
K_D(MAG-003) [M]	1.79E-09	1.97E-09	2.32E-09	1.79E-09	1.97E-09	2.42E-09

Các biến thể TCR 114-iso0, 114-iso1 và 114-iso2 còn được đặc trưng về tính đặc hiệu của chúng bằng cách phân tích liên kết với các peptit ngoài mục tiêu được dẫn xuất từ từ mô bình thường bằng phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học. Các phép đo lường được thực hiện như được mô tả ở trên. Các độ bám dính liên kết của 114-iso0-UCHT1(17) cho MAG-003 (SEQ ID NO: 1) và peptit ngoài mục tiêu CNOT1-003 (SEQ ID NO: 32), COL6A3-010 (SEQ ID NO: 179), FAM115A-001 (SEQ ID NO: 180), HEATR5A-001 (SEQ ID NO: 31), HERC4-001 (SEQ ID NO: 29), INTS4-002 (SEQ ID NO: 171), PHTF2-001 (SEQ ID NO: 181), PPP1CA-006 (SEQ ID NO: 173), RPL-007 (SEQ ID NO: 174), RPP1-001 (SEQ ID NO: 182), SAMH-001 (SEQ ID NO: 172), SETD1A-001 (SEQ ID NO: 175) trong phức hợp với HLA-A*02 đã được xác định và các cửa sổ độ bám dính đã được tính toán. Cửa sổ độ bám dính nằm trong khoảng từ hơn 200 lần đến không có liên kết ngoài mục tiêu nào cả (Bảng 9). Các đặc tính của 114-iso1-BMA(36) và 114-iso2-UCHT1(17) được phân tích bằng cách đo lường các tín hiệu liên kết cho MAG-003 (SEQ ID NO: 1) và các peptit ngoài

mục tiêu ODC-001 (SEQ ID NO: 178), NOMAP-1-0320 (SEQ ID NO: 176) và NOMAP-1-1223 (SEQ ID NO: 177) trong phức hợp với HLA-A*02 ở nồng độ 1 µM TCER™ (Fig.8C, Bảng 10). Các phản hồi ràng buộc của 1% tín hiệu MAG-003 hoặc thấp hơn đã được phát hiện chứng tỏ độ đặc hiệu cao của các biến thể TCR cho MAG-003.

Bảng 9: Tính đặc hiệu của phân tử TCER™ 114-iso0-UCHT1(17). Các giá trị K_D được đo lường bằng phép đo lường giao thoa lớp sinh học phân tích độ pha loãng nối tiếp 114-iso0-UCHT1(17) (500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM). Các cửa sổ độ bám dính được tính là K_D(peptit tương tự)/K_D(MAG-003).

	K_D [M]	K_D(peptit tương tự)/K_D(MAG-003)
MAG-003	1.56E-09	-
CNOT1-003	1.64E-06	1050
COL6A3-010	9.03E-07	579
FAM115A-001	7.84E-07	503
HEATR5A-001	3.70E-07	238
HERC4-001	4.91E-07	315
INTS4-002	1.98E-06	1273
PHTF2-001	1.02E-06	656
PPP1CA-006	Không có liên kết	Không có liên kết
RPL-007	Không có liên kết	Không có liên kết
RPP1-001	8.97E-07	576
SAMH-001	2.11E-06	1356
SETD1A-001	Không có liên kết	Không có liên kết

Bảng 10: Tính đặc hiệu của các phân tử TCER™ 114-iso1-BMA (36) và 114-iso2-UCHT1(17). Động học liên kết của 1 µM TCER™ được đo lường bằng phương pháp đo lường giao thoa lớp sinh học. Các phản hồi ở cuối giai đoạn kết hợp (tính bằng nm hoặc theo% của tín hiệu MAG-003) được thể hiện.

	114-iso1-BMA(36)	114-iso2-UCHT1(17)

ID mẫu tải	Phản hồi	Phản hồi (% của MAG-003)	Phản hồi	Phản hồi (% của MAG-003)
MAG-003	0,8246	100,0	0,8233	100,0
ODC-001	0,0061	0,7	0,0104	1,3
NOMAP-1-0320	0,0025	0,3	0,0025	0,3
NOMAP-1-1223	0,0005	0,1	0,0057	0,7

Ví dụ 6: Tiêu diệt qua trung gian TCER™ của các dòng tế bào khối u và dương tính với MAG-003

Các biến thể TCR bão hòa được biểu thị dưới dạng các phân tử TCER™ hòa tan #114-iso0-UCHT1(17), #114-iso1-UCHT1(17), #114-iso2-UCHT1(17), #114-iso0-BMA03(36), #114-iso1-BMA03(36) và #114-iso2-BMA03(36) sử dụng định dạng diabody-F_c TCR/chống lạiCD3 (xem thêm Bảng 7). Hoạt động gây độc tế bào của các phân tử TCER™ đặc hiệu đối với các dòng tế bào khối u MAG-003 dương tính và âm tính với MAG-003, tương ứng, được phân tích bằng xét nghiệm giải phóng LDH. Do đó, các dòng tế bào khối u thể hiện lượng phân tử HLA-A*02/MAG-003 khác nhau trên bề mặt tế bào được đồng ủ với PBMC từ những người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh với sự gia tăng nồng độ của các phân tử TCER™. Sau 48 giờ, sự ly giải của các dòng tế bào đích được đo lường bằng cách sử dụng các kit thử xét nghiệm độc tế bào không phóng xạ CytoTox 96 (PROMEGA). Như được thể hiện trên Fig.9 và Fig.10, các phân tử TCER™ thể hiện khả năng ly giải hiệu quả các dòng tế bào khối u dương tính với MAG-003 Hs695T, A375 và U2OS hiển thị lần lượt 1100, 230 và 120 bản sao trên mỗi tế bào khối u, như được xác định bằng định lượng dựa trên khối phổ của các phức hợp HLA-A*02/MAG-003. Đối với các xét nghiệm tiêu diệt, PBMC từ hai người cho khỏe mạnh (HBC-720 trên Fig.9 và HBC-982 trên Fig.10) đã được sử dụng. Trong cùng các thí nghiệm, dòng tế bào BV-173 biểu hiện HLA-A*02 nhưng không biểu hiện peptit MAG-003 ở các mức có thể phát hiện được, không hoặc chỉ có sự ly giải cận biên của tế bào được tạo ra bởi các phân tử TCER™ nhị đặc hiệu chỉ ra tính đặc hiệu của các miền TCR .

Ví dụ 7: Hiệu quả in vivo trên chuột NOG mang khối u ghép ngoại lai

Nghiên cứu dược lực học đã được thực hiện trên dòng chuột NOG siêu thiếu miễn dịch để kiểm tra khả năng của các phân tử TCER™ trong việc thu nạp hoạt động của tế bào T miễn dịch của người bằng cách liên kết cụ thể với kháng nguyên tế bào T và bằng cách liên kết cụ thể với phức hợp HLA-peptit đặc hiệu cho khối u của người trên tế bào ung thư ở người. Dòng chuột NOG chứa dòng tế bào khối u của người được tiêm dưới da HS695T được tiêm vào tĩnh mạch với các ghép ngoại lai tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của người. PBMC của người ($1x10^7$ tế bào/chuột) được cấy trong vòng 24 giờ khi thể tích khối u Hs695T riêng lẻ đạt 50 mm^3 như được tính toán sau khi đo lường bằng thước cặp. Điều trị được bắt đầu trong vòng một giờ sau khi cấy ghép tế bào máu người. Tám đến mười con chuột cái trên mỗi nhóm (ngẫu nhiên theo kích thước khối u) được tiêm bolus vào tĩnh mạch (5 mL/kg thể trọng, hai lần mỗi tuần, sáu liều) vào tĩnh mạch đuôi. Liều tiêm phân tử TCER™ là 0,5 (nhóm 2) và 0,05 (nhóm 3 và 4) mg/kg thể trọng x lần tiêm, PBS được sử dụng trong nhóm điều khiển phương tiện (nhóm 1). Như được thể hiện trên Fig.11 đối với từng con chuột, việc điều trị với các phân tử TCER™ gây ra các phản ứng chống lại khối u rõ rệt. Điều trị bằng TCER™ (SEQ ID NO: 169 và 170) nhắm đến PRAME-004 (SEQ ID NO: 168, nhóm 2) ức chế mạnh sự phát triển của khối u như được chỉ ra bằng cách giảm độ tăng thể tích khối u trung bình từ các mức cơ bản (bắt đầu ngẫu nhiên) của 90 mm^3 lên 209 mm^3 ở ngày 25 so với mức tăng quan sát được ở nhóm điều khiển phương tiện 1 từ các mức cơ bản 74 mm^3 lên 1081 mm^3 ở ngày 25. Điều trị bằng TCER™ nhắm đến MAG-003 (SEQ ID NO: 127 và 130, nhóm 3; SEQ ID NO: 135 và 136, nhóm 4) gây ra sự thuyên giảm hoàn toàn khối u Hs695T ở tất cả chuột ở ngày 18 cho đến khi kết thúc nghiên cứu ở ngày 25 so với các mức cơ bản là 86 mm^3 (nhóm 3) và 80 mm^3 (nhóm 4) vào ngày ngẫu nhiên.

Ví dụ 8: An toàn in vitro trên các tế bào khỏe mạnh sơ cấp

Tiểu sử an toàn của phân tử TCER™ 114-iso1-BMA(36) đã được đánh giá trong các thí nghiệm tiêu diệt LDH với các tế bào sơ cấp mô bình thường của người thuộc các cơ quan khác nhau. Fig.12 thể hiện kết quả đồng nuôi cấy của 11 tế bào mô khỏe mạnh sơ cấp khác nhau (HLA-A*02+) với các tế bào hiệu ứng PBMC từ những người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh theo tỷ lệ 1:10 với nồng độ TCER™ tăng. Các tế bào được đồng ủ trong hỗn hợp 1:1 của môi trường đặc hiệu tế bào sơ cấp mô bình thường

và môi trường tế bào T. Để xác định cửa sổ an toàn, các phân tử TCER™ đã được đồng ủ trong thiết lập giống hệt với dòng tế bào khối u MAG-003 dương tính với Hs695T trong sự kết hợp môi trường tương ứng của các tế bào sơ cấp của mô bình thường. Sau 48 giờ đồng nuôi cấy, các chất nổi được thu hoạch và quá trình ly giải tế bào khối u được phân tích bằng cách đo lường sự giải phóng LDH bằng kit thử LDH-Glo™ (Promega).

Trên Fig.12, mỗi biểu đồ gây độc tế bào thể hiện sự giải phóng LDH của loại tế bào sơ cấp mô bình thường (các vòng tròn trống) so với dòng tế bào khối u kiểm soát Hs695T (các vòng tròn đầy) trong cùng tổ hợp môi trường sau khi đồng ủ với PBMC và nồng độ tăng của phân tử TCER. Trong tất cả các trường hợp, phản hồi chống lại các tế bào sơ cấp mô bình thường là quá thấp để tính toán EC_{50}. Thay vào đó, đã xác định cửa sổ an toàn dựa trên mức ảnh hưởng quan sát được thấp nhất (lowest observed effect level - LOEL) được xác định là nồng độ TCER™ đầu tiên có phản hồi vượt quá giá trị giới hạn. Giới hạn được xác định là ([độ lệch chuẩn so với tất cả các bản sao ba x 3] + mẫu mô bình thường kiểm soát không có TCER™) và được biểu thị dưới dạng đường chấm trong mỗi biểu đồ độc tế bào. Đối với mỗi loại tế bào mô bình thường, cửa sổ an toàn dựa trên LOEL được xác định là lớn hơn 1.000 lần.

Tiểu sử an toàn của phân tử TCER™ 114-iso1-BMA(36) đã được đánh giá trong thí nghiệm tiêu diệt LDH thứ hai với 12 tế bào mô khỏe mạnh sơ cấp khác nhau (HLA-A*02+) trong đó một số trùng lặp với thí nghiệm đầu tiên. Các điều kiện thí nghiệm được sử dụng như được mô tả ở trên.

Trên Fig.16, mỗi biểu đồ độc tế bào thể hiện sự giải phóng LDH của loại tế bào sơ cấp mô bình thường (các vòng tròn trống) so với dòng tế bào khối u kiểm soát Hs695T (các vòng tròn đầy) trong cùng kết hợp môi trường sau khi đồng ủ với các PBMC và nồng độ tăng của phân tử TCER™. Trong tất cả các trường hợp, phản hồi chống lại các tế bào sơ cấp của mô bình thường là quá thấp để tính toán EC_{50}. Thay vào đó, đã xác định cửa sổ an toàn dựa trên mức ảnh hưởng quan sát được thấp nhất (LOEL) được xác định là nồng độ TCER™ đầu tiên có phản hồi vượt quá giá trị giới hạn. Giới hạn được xác định là ([độ lệch chuẩn so với tất cả các bản sao ba x 3] + mẫu mô bình thường kiểm soát không có TCER™) và được biểu thị dưới dạng đường chấm

trong mỗi biểu đồ độc tế bào. Đối với mỗi loại tế bào mô bình thường, cửa sổ an toàn dựa trên LOEL được xác định là lớn hơn 1.000 lần.

Ví dụ 9: Hiệu quả in vivo với điều trị mỗi tuần một lần ở chuột NOG mang ghép ngoại lai khối u

Nghiên cứu dược lực học đã được thực hiện trên dòng chuột NOG siêu thiếu miễn dịch để kiểm tra khả năng của các phân tử TCER™ trong việc thu nạp hoạt động của tế bào T miễn dịch của người bằng cách liên kết cụ thể với kháng nguyên tế bào T và bằng cách liên kết cụ thể với phức hợp HLA-peptit đặc hiệu cho khối u của người trên tế bào ung thư ở người. Dòng chuột NOG chứa dòng tế bào khối u của người được tiêm dưới da HS695T được tiêm vào tĩnh mạch với các ghép ngoại lai tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của người. PBMC của người ($1x10^7$ tế bào/chuột) được cấy trong vòng 24 giờ khi thể tích khối u Hs695T riêng lẻ đạt 50 mm^3 như được tính toán sau khi đo lường bằng thước cặp. Điều trị được bắt đầu trong vòng một giờ sau khi cấy ghép tế bào máu người. Tám đến mười con chuột cái trên mỗi nhóm (ngẫu nhiên theo kích thước khối u) được tiêm bolus vào tĩnh mạch (5 mL/kg thể trọng, hai lần mỗi tuần, sáu liều) vào tĩnh mạch đuôi. Liều tiêm phân tử TCER™ là 0,01 (nhóm 2 và 3) mg/kg thể trọng x lần tiêm, PBS được sử dụng trong nhóm điều khiển phương tiện (nhóm 1). Như được thể hiện trên Fig.13, việc điều trị với các phân tử TCER™ gây ra các phản ứng chống lại khối u rõ rệt. Điều trị bằng TCER™ (SEQ ID NO: 137 và 136, nhóm 2) và 114-iso1-UCHT1(V17opt) (SEQ ID NO: 131 và 167, nhóm 3) gây ra sự thuyên giảm của khối u Hs695T ở tất cả các con chuột vào ngày 21. Sự phát triển của khối u bị ức chế mạnh do sự gia tăng thể tích khối u trung bình giảm từ các mức cơ bản (bắt đầu ngẫu nhiên) là 84 mm^3 đến 8 mm^3 (nhóm 2) và từ 83 mm^3 đến 14 mm^3 (nhóm 3) vào ngày 21 so với sự gia tăng quan sát được trong quá trình kiểm soát phương tiện (nhóm 1) từ mức cơ bản 85 mm^3 lên 1024 mm^3 vào ngày 21. Sự thuyên giảm hoàn toàn được quan sát thấy ở 2 con chuột của nhóm 2 và 2 con chuột của nhóm. 3.

Ví dụ 10: Dược động học in vivo ở chuột NOG

Các đặc tính dược động học của TCER™ 114-iso1-UCHT1(17) (SEQ ID NOs: 130 và 131) đã được phân tích ở những con chuột NOG siêu thiếu miễn dịch được tiêm tĩnh mạch đơn 2 mg/kg thể trọng. Các mẫu huyết tương được thu thập từ đám rối

retro-bulbar tại các thời điểm 0 giờ, 0,1 giờ, 2 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 120 giờ, 240 giờ và 360 giờ. Các mức huyết tương của 114-iso1-UCHT1(17) được xác định bằng ELISA sử dụng hai thiết lập xét nghiệm khác nhau (xét nghiệm F_c – V_L và xét nghiệm CD3 - pMHC). Sử dụng thiết lập xét nghiệm F_c – V_L, mức huyết tương TCER™ được định lượng bằng cách phát hiện các tiểu đơn vị protein tương ứng. Tóm lại, IgG F_c chống lại người của dê được phủ ở nồng độ 2 µg/ml trong PBS ở 4°C qua đêm. Các vị trí liên kết còn lại bị chặn sử dụng PBS chứa 2% BSA. Các mẫu được pha loãng trong chất đệm chặn được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi phát hiện với Protein L-HRP và dung dịch chất nền TMB. Sử dụng xét nghiệm CD3 - pMHC, các mức huyết tương của TCER™ 114-iso1-UCHT1(17) được xác định thông qua hoạt tính liên kết nhị đặc hiệu chỉ đo lường các phân tử có khả năng liên kết đồng thời với cả hai phân tử đích. CD3δε- F_c được tạo ra bằng cách hợp nhất các miền ngoại bào của CD3δ và CD3ε của người với phần cuối N của các miền F_c như được sử dụng trong các cấu trúc TCER™ (chứa đột biến núm thành lỗ và thêm thẻ His đầu cuối C). Các phân tử CD3δε- F_c được biểu hiện trong các tế bào ExpiCHO và được tinh chế bằng sắc ký độ bám dính Protein A, sau đó là sắc ký loại trừ kích thước như được mô tả ở trên. CD3δε- F_c được phủ ở nồng độ 1 µg/ml trong PBS ở 4°C qua đêm. Việc chặn và ủ mẫu được thực hiện như được mô tả ở trên, sau đó là phát hiện hai bước bằng cách sử dụng HLA-A*02/MAG-003 và anti-b2m-HRP. Các nồng độ huyết tương của các mẫu thu được bằng cách nội suy từ các đường chuẩn tương ứng. Cả hai thiết lập xét nghiệm đều dẫn đến việc xác định nồng độ huyết tương TCER™ tương tự thể hiện tính toàn vẹn của protein cũng như hoạt tính liên kết của phân tử được giữ lại trong huyết tương (Fig.14). Hồi quy tuyến tính các điểm thời gian 24 giờ, 48 giờ, 120 giờ, 240 giờ và 360 giờ thể hiện chu kỳ bán rã của huyết tương đầu cuối là 150 giờ. Kết quả thể hiện thời gian bán hủy (T1/2) của 114-iso1-UCHT1(17) là khoảng 6-7 ngày.

Ví dụ 11: Phát hiện peptit MAG-003 trên các mô sơ cấp bằng phương pháp khối phổ

Các phân tử HLA từ các mẫu mô được đông lạnh bằng sốc được tinh chế, và các peptit liên kết với HLA được phân lập. Các peptit được phân lập được tách ra, và các trình tự được xác định bằng các thí nghiệm khối phổ-sắc ký lỏng (liquid chromatography-mass spectrometry - LC-MS) ion hóa phun điện nano (nano-

electrospray-ionization - nanoESI) trực tuyến. MAG-003 được xác định trên nhiều mẫu mô được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp đếm ion của dữ liệu LC-MS không được dán nhãn. Phương pháp giả định rằng các diện tích tín hiệu LC-MS của peptit tương ứng với sự dồi dào của nó trong mẫu. Tất cả các tín hiệu định lượng của peptit trong các thí nghiệm LC-MS khác nhau đã được chuẩn hóa dựa trên xu hướng trung tâm, được tính trung bình trên mỗi mẫu và được hợp nhất vào biểu đồ, được gọi là tiểu sử thể hiện. Tiểu sử thể hiện hợp nhất các phân tích phương pháp khác nhau như tìm kiếm cơ sở dữ liệu protein, phân cụm phổ, tháo cuộn trạng thái nạp điện (giải nạp điện) và căn chỉnh thời gian duy trì. Tất cả dữ liệu định lượng và định lượng được lấy tự động đều được kiểm tra thủ công (xem Fig.18).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó
polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 136, và
polypeptit thứ hai bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 137.

2. Dược phẩm bao gồm protein theo điểm 1 và chất mang dược dụng, chất pha loãng, chất ổn định, và/hoặc tá dược.

3. Protein bao gồm polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó
polypeptit thứ nhất chỉ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 136, và
polypeptit thứ hai chỉ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 137.

4. Dược phẩm bao gồm protein theo điểm 3 và chất mang dược dụng, chất pha loãng, chất ổn định và/hoặc tá dược.

5. Protein chỉ chứa polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, trong đó
polypeptit thứ nhất chỉ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 136, và
polypeptit thứ hai chỉ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 137.

6. Dược phẩm bao gồm protein theo điểm 5 và chất mang dược dụng, chất pha loãng, chất ổn định và/hoặc tá dược.

7. Dược phẩm bao gồm protein theo điểm 1, trong đó protein này được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang dược dụng hoặc môi trường nước.

8. Dược phẩm bao gồm protein theo điểm 3, trong đó protein này được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang dược dụng hoặc môi trường nước.

9. Dược phẩm bao gồm protein theo điểm 5, trong đó protein này được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang dược dụng hoặc môi trường nước.

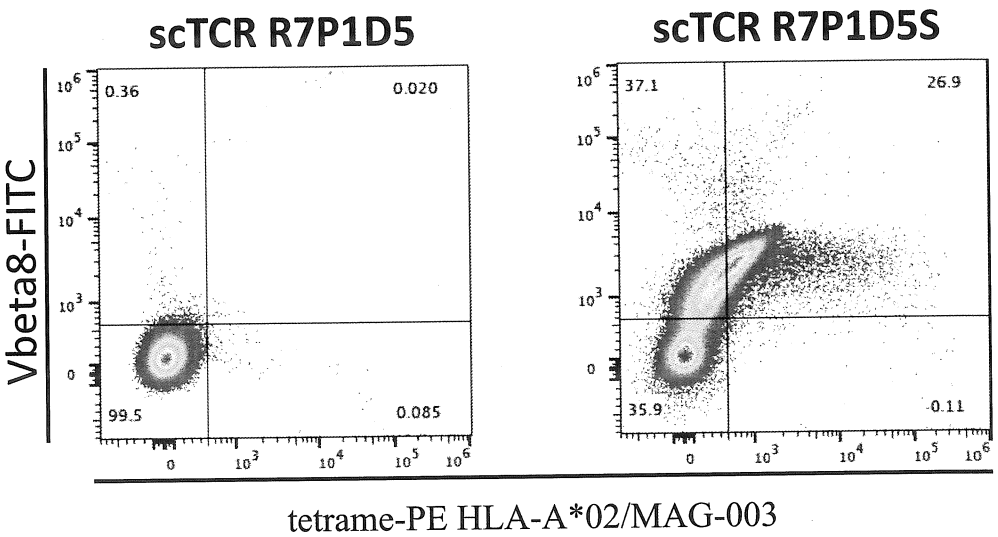

scTCR R7P1D5
scTCR R7P1D5S
Vbeta8-FITC
0.36
0.020
99.5
0.085
37.1
26.9
35.9
0.11
tetrame-PE HLA-A*02/MAG-003

Fig.1

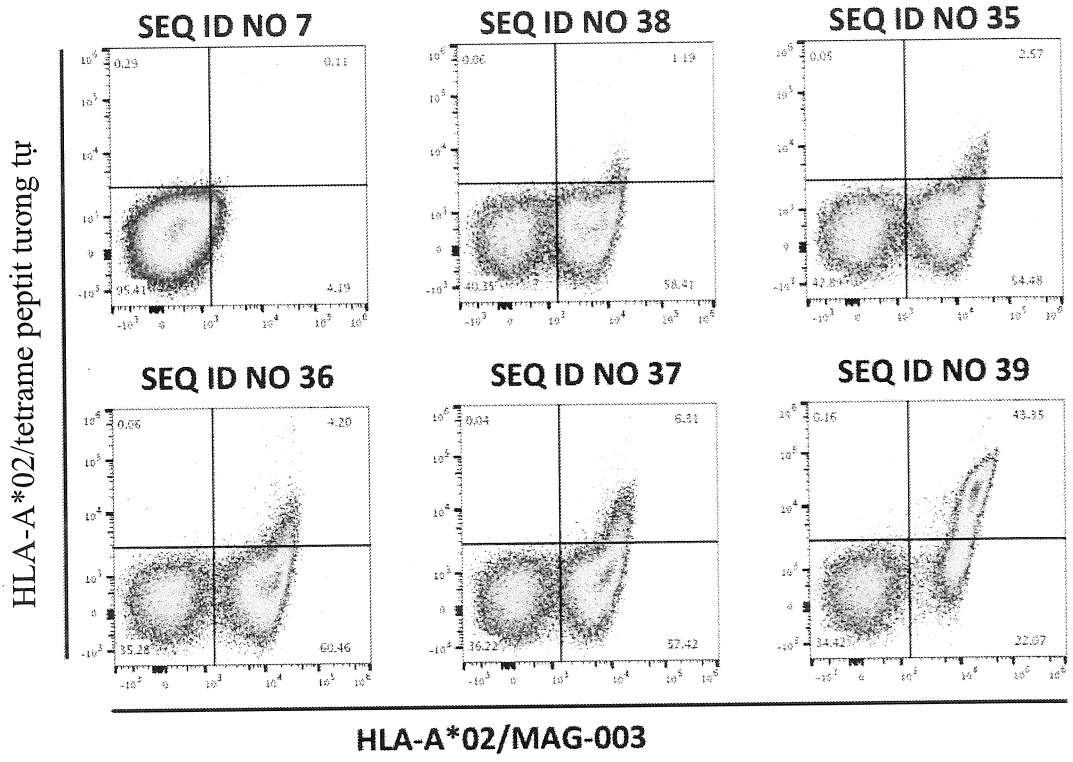

SEQ ID NO 7
SEQ ID NO 38
SEQ ID NO 35
SEQ ID NO 36
SEQ ID NO 37
SEQ ID NO 39
HLA-A*02/tetrame peptit tương tự
HLA-A*02/MAG-003

Fig.2A

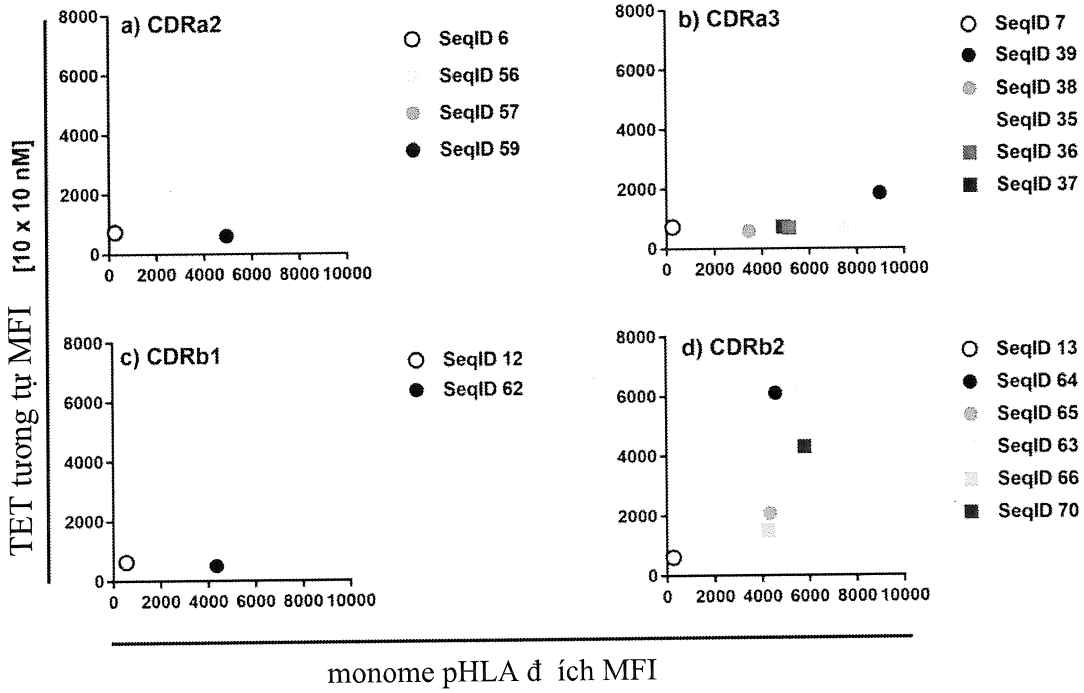

a) CDRa2
b) CDRa3
c) CDRb1
d) CDRb2
SeqID 6
SeqID 56
SeqID 57
SeqID 59
SeqID 7
SeqID 39
SeqID 38
SeqID 35
SeqID 36
SeqID 37
SeqID 12
SeqID 62
SeqID 13
SeqID 64
SeqID 65
SeqID 63
SeqID 66
SeqID 70
TET tương tự MFI [10 x 10 nM]
monome pHLA đích MFI

Fig.2

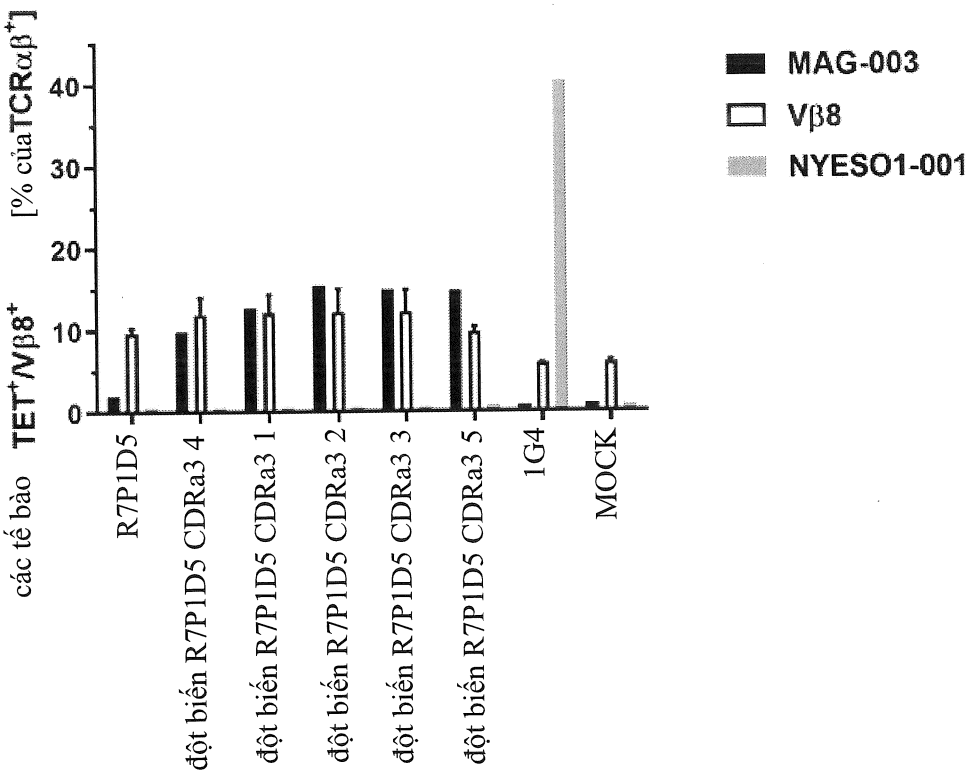

các tế bào TET+Vβ8+ [% của TCRαβ+]
40
30
20
10
0
R7P1D5
đột biến R7P1D5 CDRa3 4
đột biến R7P1D5 CDRa3 1
đột biến R7P1D5 CDRa3 2
đột biến R7P1D5 CDRa3 3
đột biến R7P1D5 CDRa3 5
1G4
MOCK
MAG-003
Vβ8
NYESO1-001

Fig.3

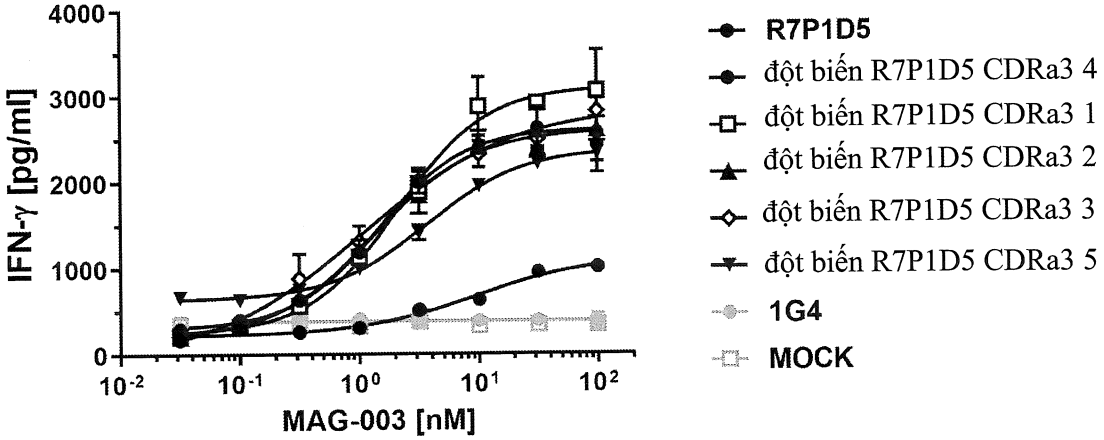

IFN-γ [pg/ml]
4000
3000
2000
1000
0
10-2
10-1
100
101
102
MAG-003 [nM]
R7P1D5
đột biến R7P1D5 CDRa3 4
đột biến R7P1D5 CDRa3 1
đột biến R7P1D5 CDRa3 2
đột biến R7P1D5 CDRa3 3
đột biến R7P1D5 CDRa3 5
1G4
MOCK

Fig.4

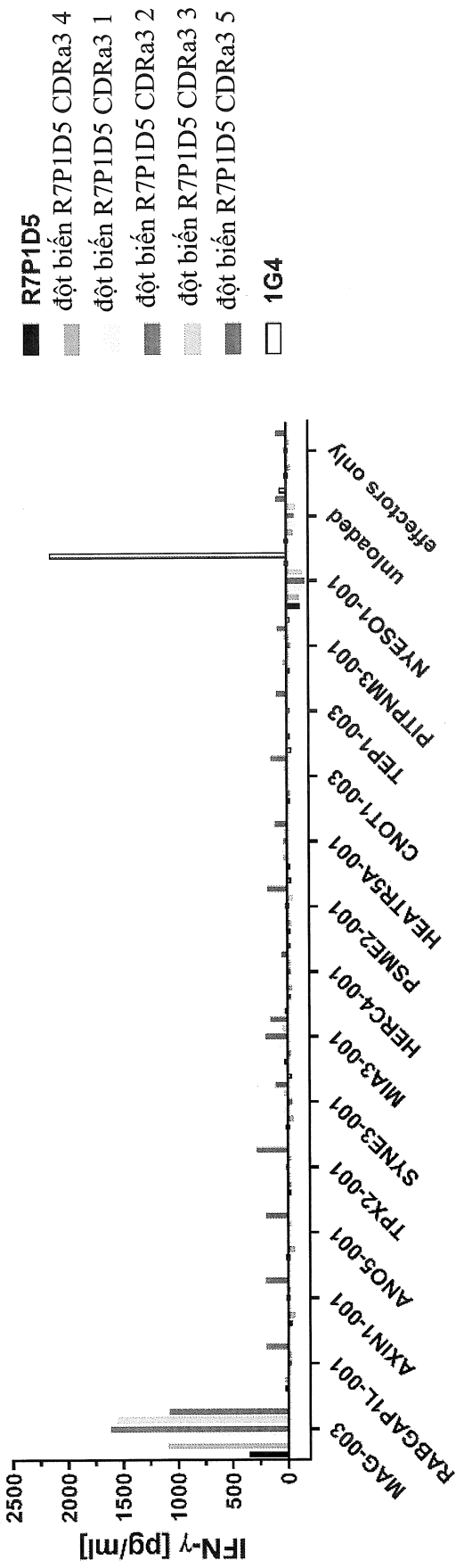

R7P1D5
đột biến R7P1D5 CDRa3 4
đột biến R7P1D5 CDRa3 1
đột biến R7P1D5 CDRa3 2
đột biến R7P1D5 CDRa3 3
đột biến R7P1D5 CDRa3 5
1G4
IFN-γ [pg/ml]
2500
2000
1500
1000
500
0
MAG-003
RABGAP1L-001
AXIN1-001
ANO5-001
TPX2-001
SYNE3-001
MIA3-001
HERC4-001
PSME2-001
HEATR5A-001
CNOT1-003
TEP1-003
PITPNM3-001
NYESO1-001
unloaded
effectors only

Fig.5

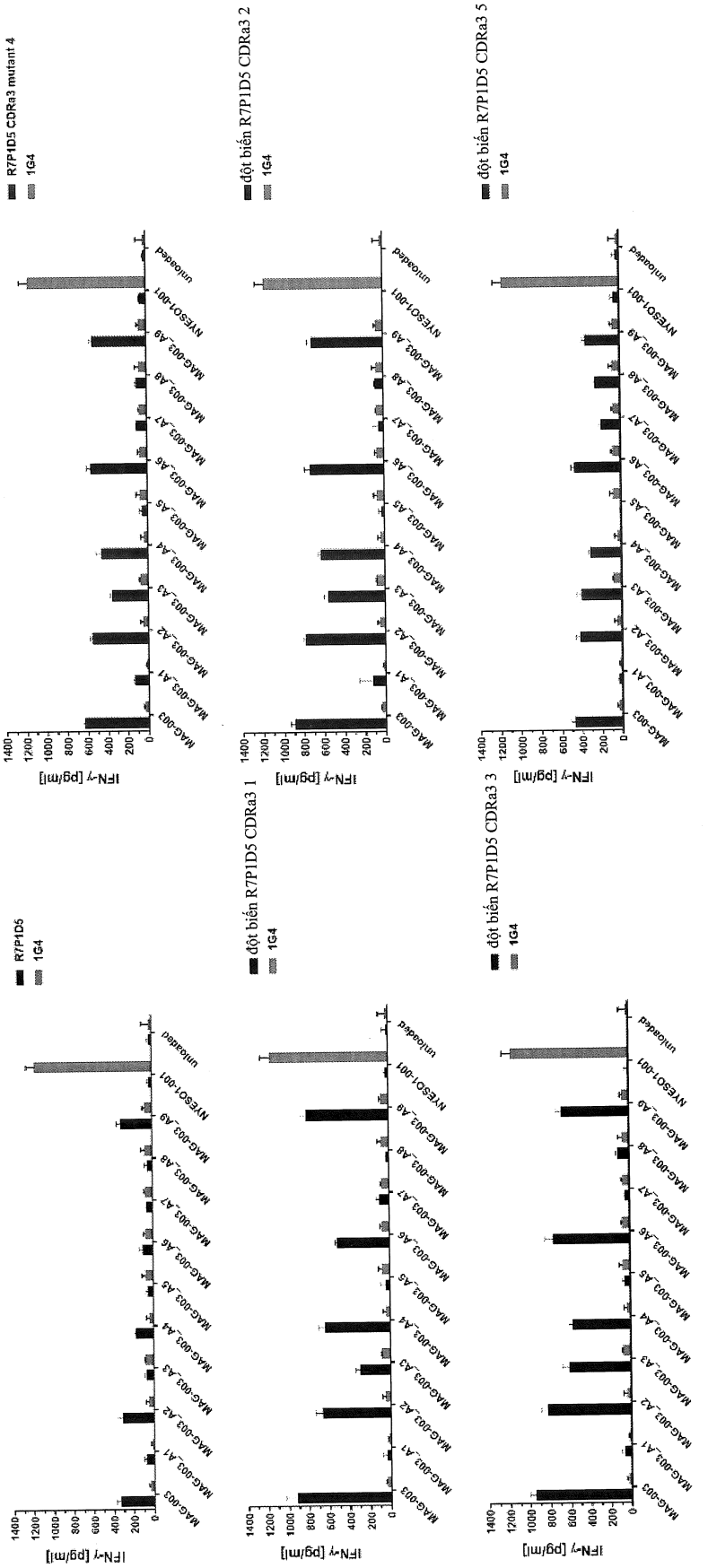

R7P1D5 CDRa3 mutant 4
1G4
đột biến R7P1D5 CDRa3 2
1G4
đột biến R7P1D5 CDRa3 5
1G4
R7P1D5
1G4
đột biến R7P1D5 CDRa3 1
1G4
đột biến R7P1D5 CDRa3 3
1G4
IFN-γ [pg/ml]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MAG-003
MAG-003_A1
MAG-003_A2
MAG-003_A3
MAG-003_A4
MAG-003_A5
MAG-003_A6
MAG-003_A7
MAG-003_A8
MAG-003_A9
NYESO1-001
unloaded

Fig.6

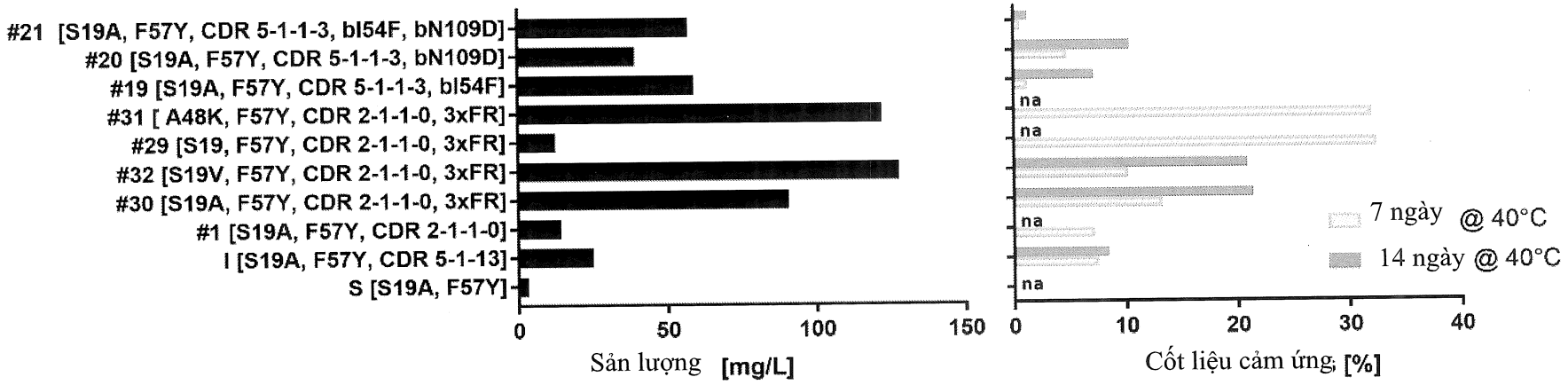

#21 [S19A, F57Y, CDR 5-1-1-3, bI54F, bN109D]
#20 [S19A, F57Y, CDR 5-1-1-3, bN109D]
#19 [S19A, F57Y, CDR 5-1-1-3, bI54F]
#31 [A48K, F57Y, CDR 2-1-1-0, 3xFR]
#29 [S19, F57Y, CDR 2-1-1-0, 3xFR]
#32 [S19V, F57Y, CDR 2-1-1-0, 3xFR]
#30 [S19A, F57Y, CDR 2-1-1-0, 3xFR]
#1 [S19A, F57Y, CDR 2-1-1-0]
I [S19A, F57Y, CDR 5-1-13]
S [S19A, F57Y]
0
50
100
150
Sản lượng [mg/L]
na
na
na
na
0
10
20
30
40
7 ngày @ 40°C
14 ngày @ 40°C
Cốt liệu cảm ứng, [%]

Fig.7A

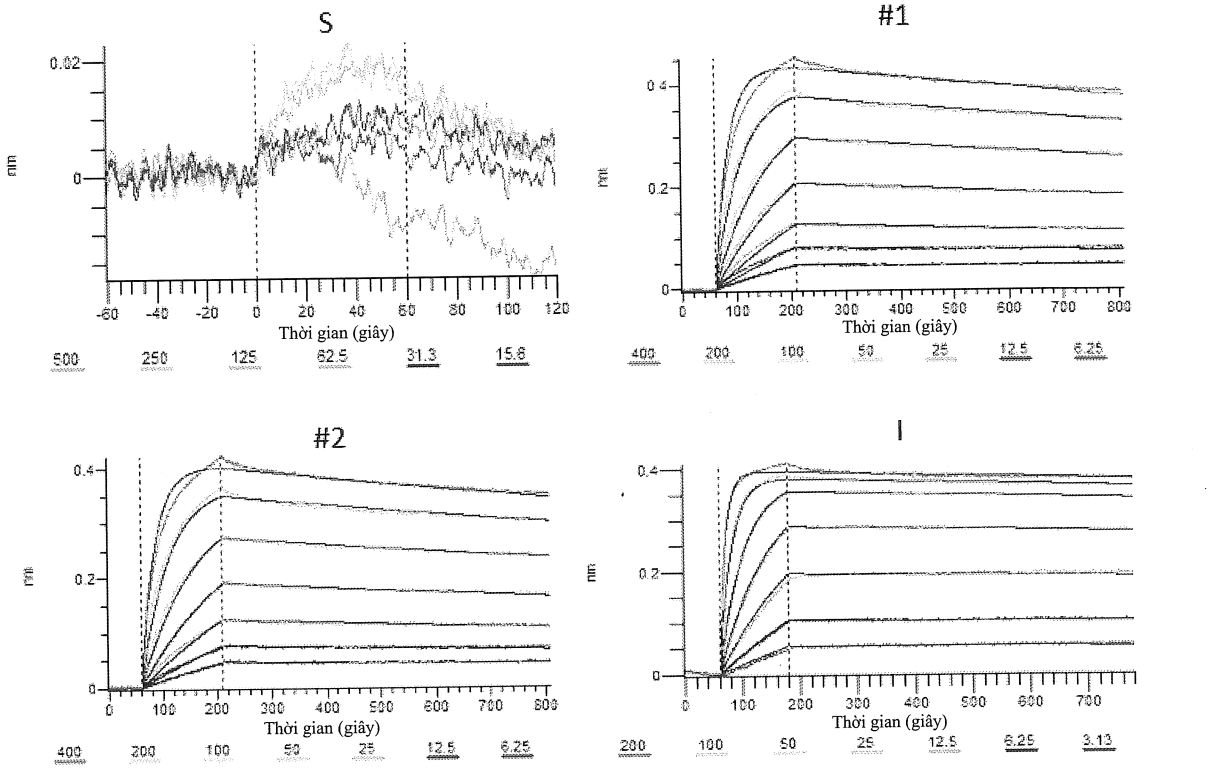

S
#1
#2
I
nm
Thời gian (giây)
500
250
125
62.5
31.3
15.6
400
200
100
50
25
12.5
6.25
3.13

Fig.7B

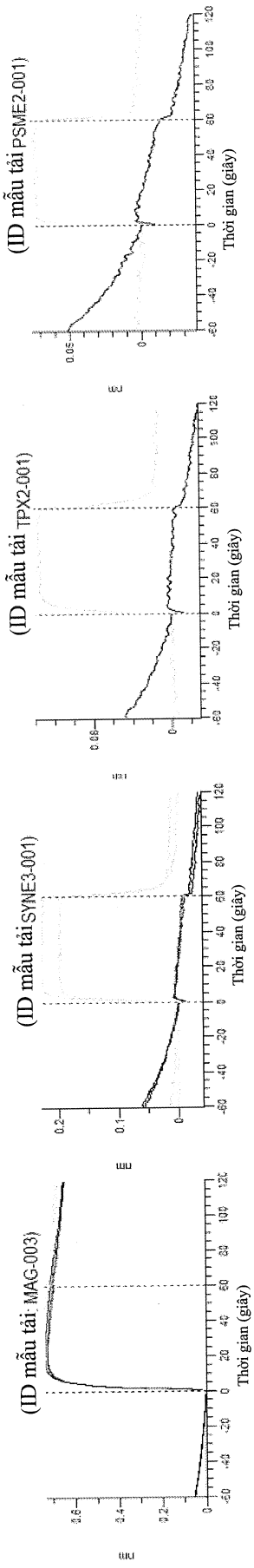

(ID mẫu tải MAG-003)
(ID mẫu tải SYNE3-001)
(ID mẫu tải TPX2-001)
(ID mẫu tải PSME2-001)
Thời gian (giây)

Fig.7C

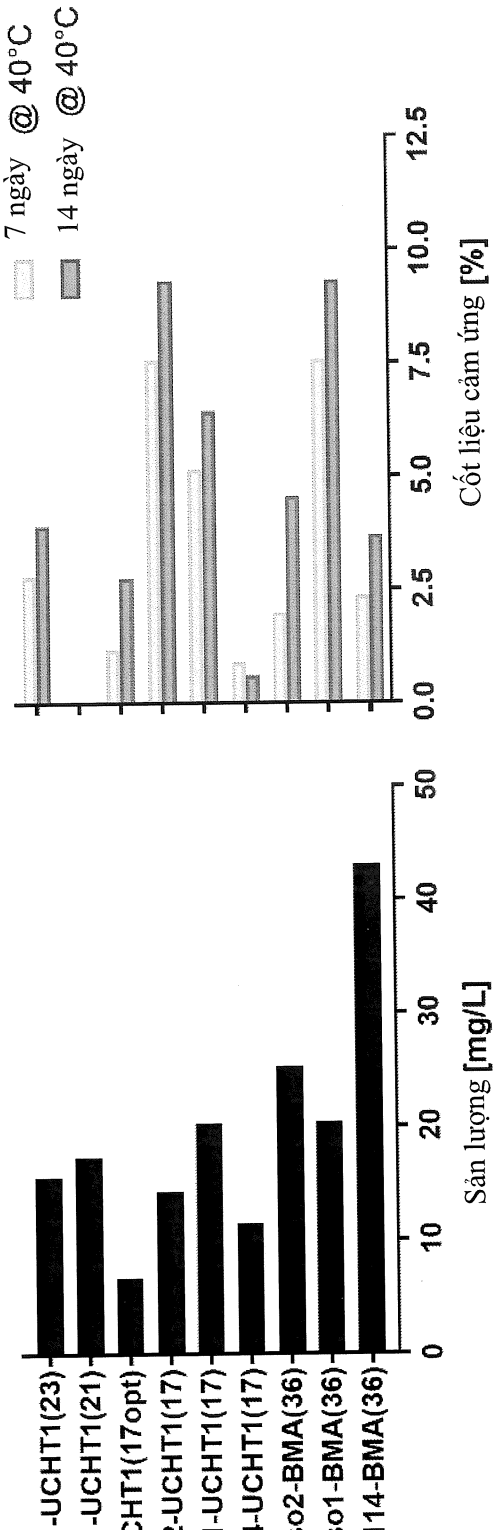

7 ngày @ 40°C
14 ngày @ 40°C
Cốt liệu cảm ứng [%]
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
Sản lượng [mg/L]
0
10
20
30
40
50
114-iso1-UCHT1(23)
114-iso1-UCHT1(21)
114-iso1-UCHT1(17opt)
114-iso2-UCHT1(17)
114-iso1-UCHT1(17)
114-UCHT1(17)
114-iso2-BMA(36)
114-iso1-BMA(36)
114-BMA(36)

Fig.8A

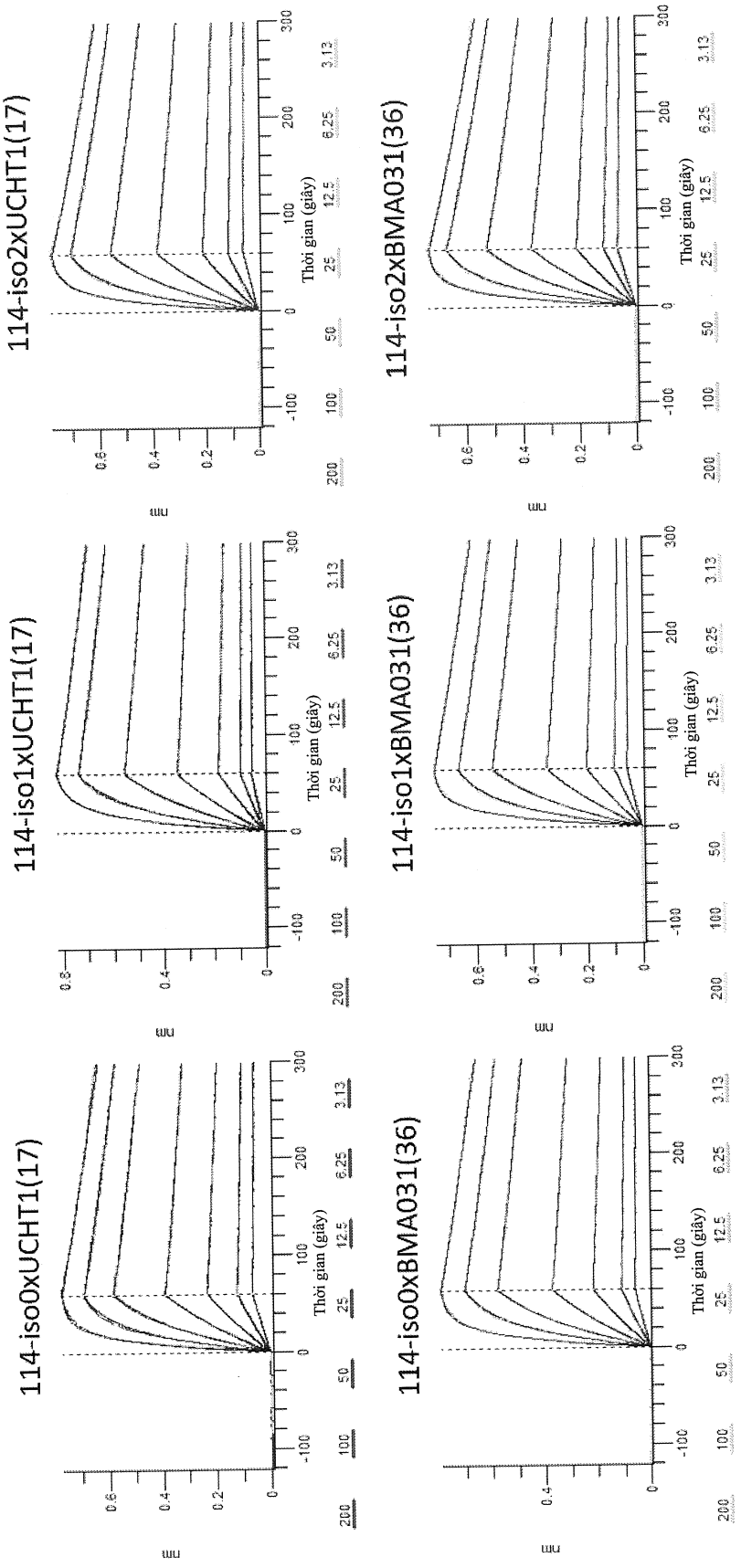

114-iso2xUCHT1(17)
114-iso2xBMA031(36)
114-iso1xUCHT1(17)
114-iso1xBMA031(36)
114-iso0xUCHT1(17)
114-iso0xBMA031(36)
nm
Thời gian (giây)

Fig.8B

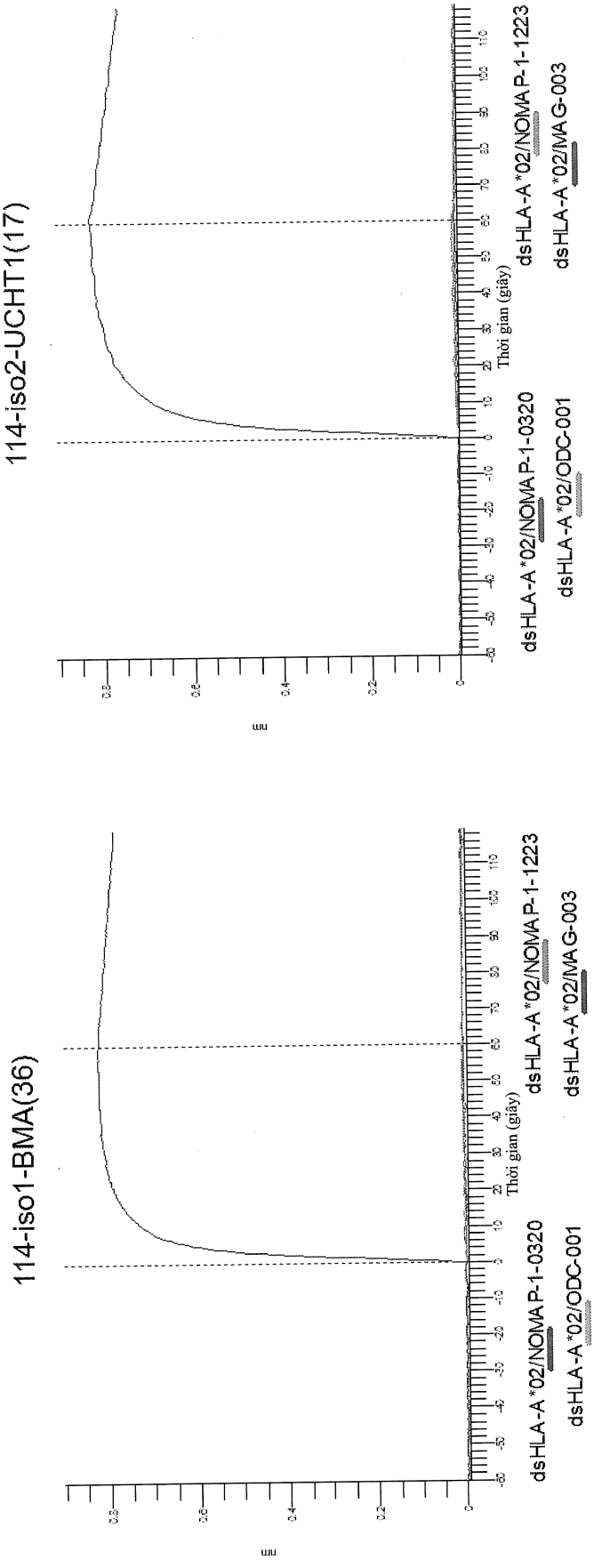

114-iso2-UCHT1(17)
nm
Thời gian (giây)
dsHLA-A*02/NOMAP-1-0320
dsHLA-A*02/ODC-001
dsHLA-A*02/NOMAP-1-1223
dsHLA-A*02/MAG-003
114-iso1-BMA(36)
nm
Thời gian (giây)
dsHLA-A*02/NOMAP-1-0320
dsHLA-A*02/ODC-001
dsHLA-A*02/NOMAP-1-1223
dsHLA-A*02/MAG-003

Fig.8C

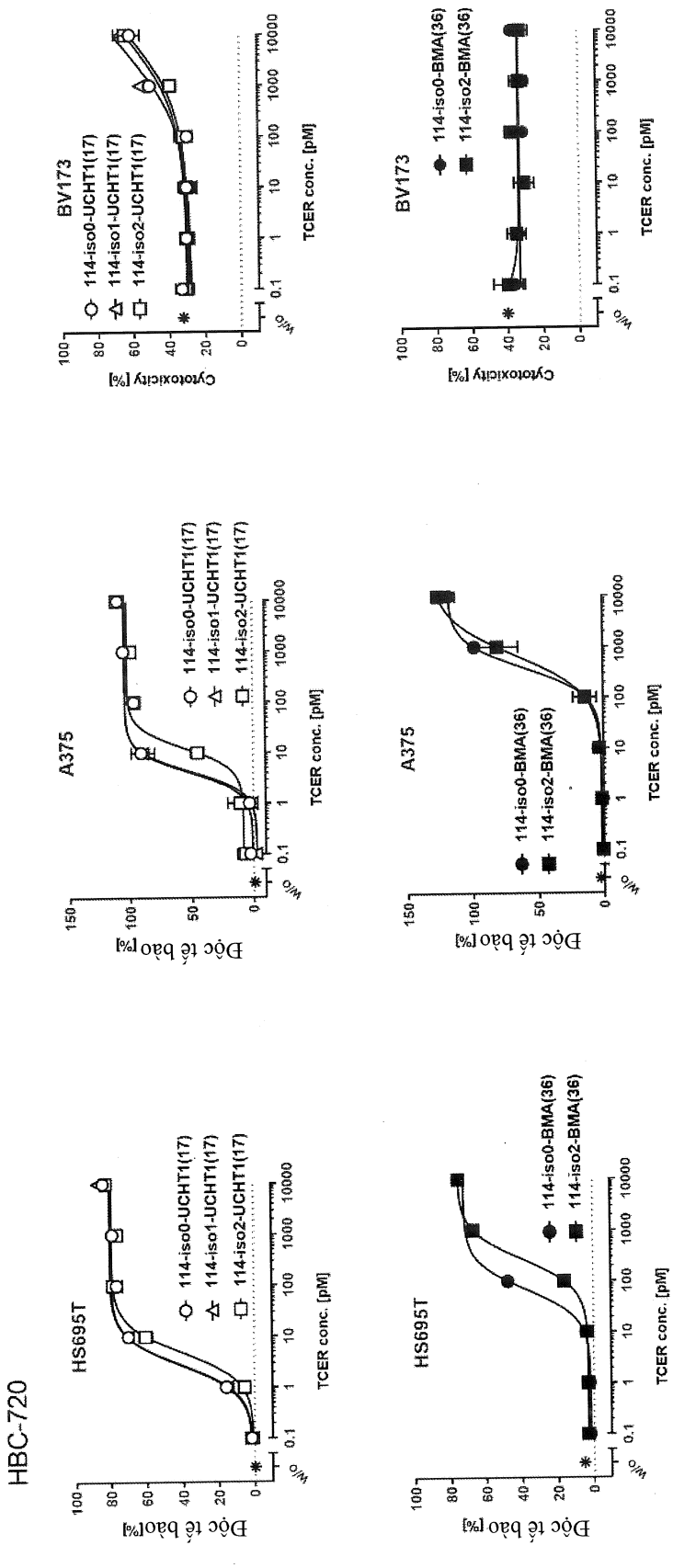

HBC-720
HS695T
A375
BV173
Độc tế bào [%]
Cytotoxicity [%]
TCER conc. [pM]
w/o
0.1
1
10
100
1000
10000
0
20
40
60
80
100
150
50
114-iso0-UCHT1(17)
114-iso1-UCHT1(17)
114-iso2-UCHT1(17)
114-iso0-BMA(36)
114-iso2-BMA(36)

Fig.9

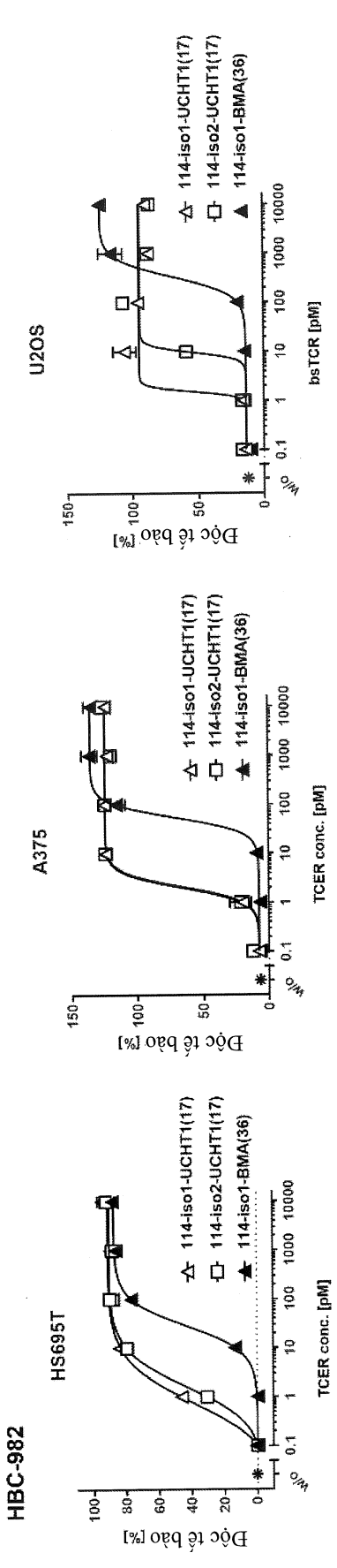

HBC-982
HS695T
A375
U2OS
Độc tế bào [%]
TCER conc. [pM]
bsTCR [pM]
w/o
0.1
1
10
100
1000
10000
114-iso1-UCHT1(17)
114-iso2-UCHT1(17)
114-iso1-BMA(36)

Fig.10

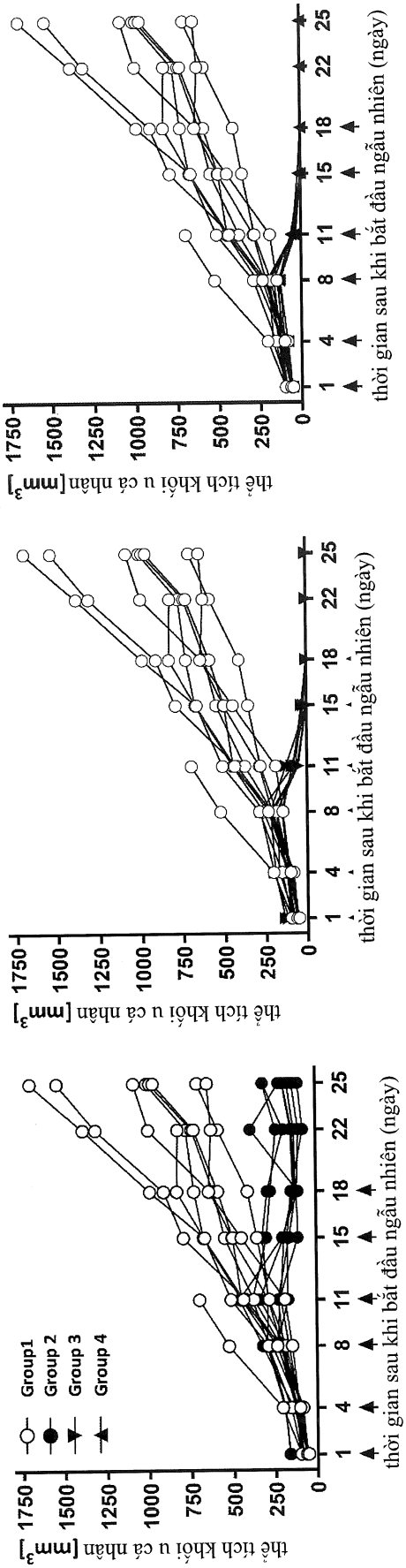

thể tích khối u cá nhân [mm³]
thời gian sau khi bắt đầu ngẫu nhiên (ngày)
Group1
Group 2
Group 3
Group 4

Fig.11

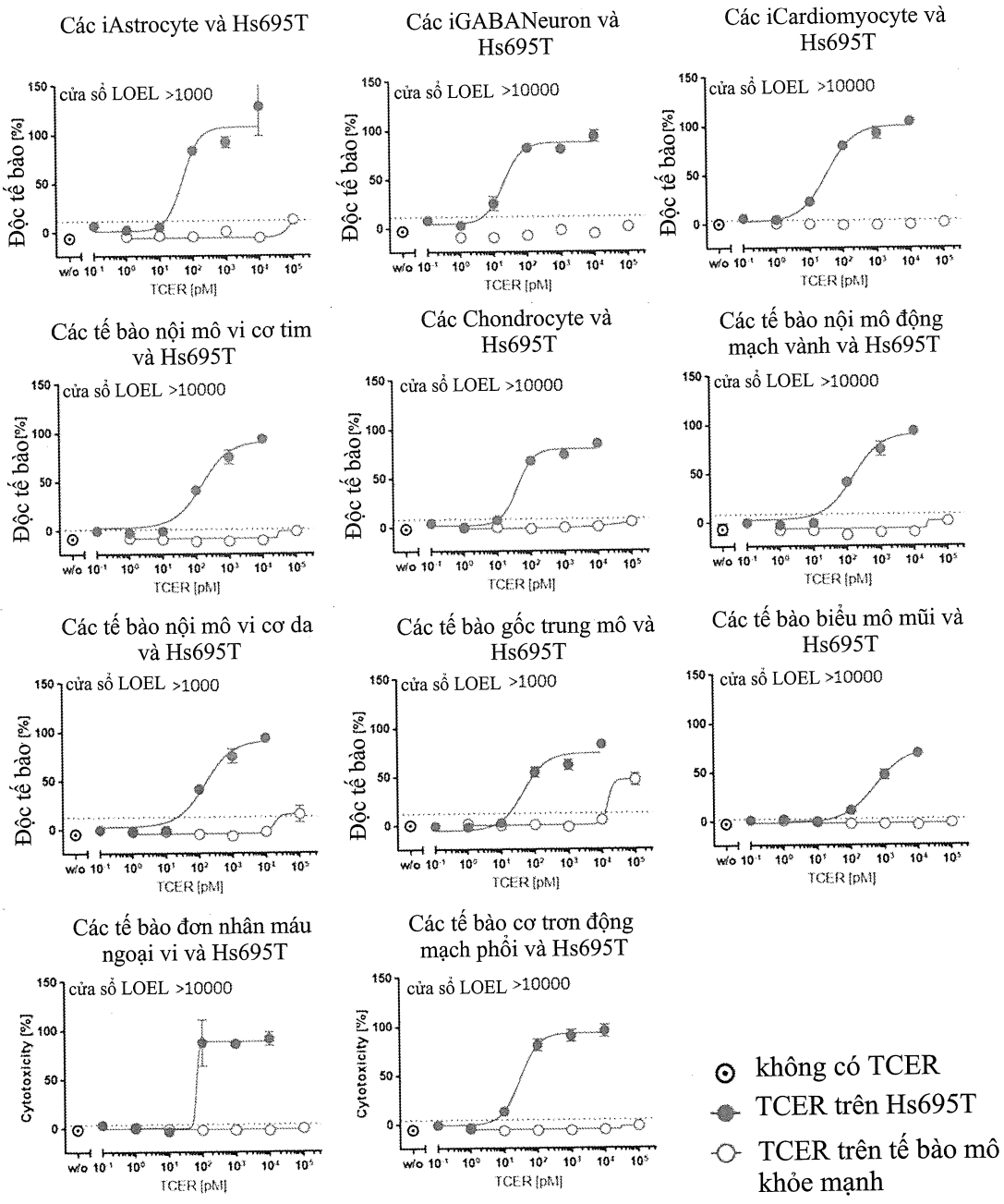
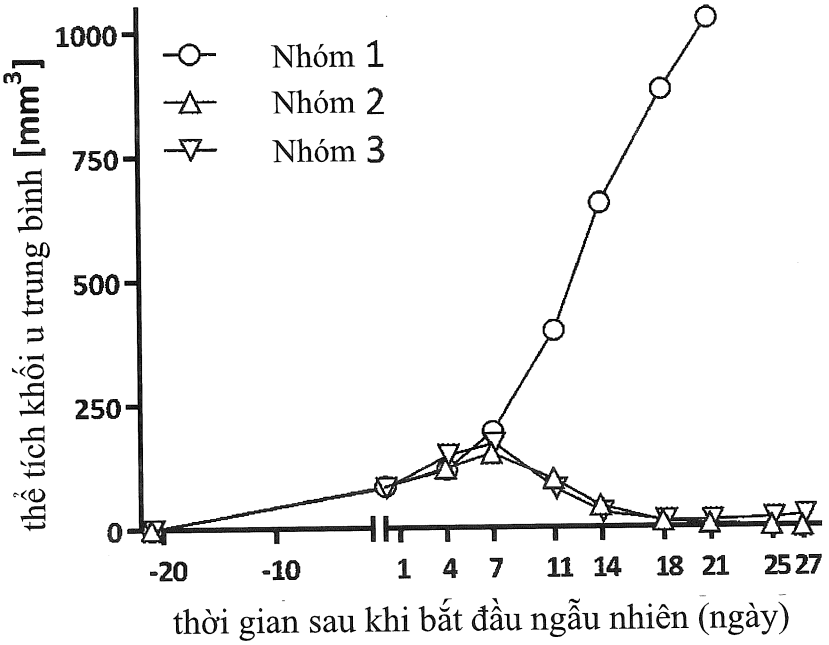

Các iAstrocyte và Hs695T
cửa sổ LOEL >1000
Các iGABANeuron và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các iCardiomyocyte và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các tế bào nội mô vi cơ tim và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các Chondrocyte và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các tế bào nội mô động mạch vành và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các tế bào nội mô vi cơ da và Hs695T
cửa sổ LOEL >1000
Các tế bào gốc trung mô và Hs695T
cửa sổ LOEL >1000
Các tế bào biểu mô mũi và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Các tế bào cơ trơn động mạch phổi và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
Độc tế bào [%]
Cytotoxicity [%]
TCER [pM]
không có TCER
TCER trên Hs695T
TCER trên tế bào mô khỏe mạnh

Fig.12


1000
750
500
250
0
thể tích khối u trung bình [mm3]
Nhóm 1
Nhóm 2
Nhóm 3
-20
-10
1
4
7
11
14
18
21
25
27
thời gian sau khi bắt đầu ngẫu nhiên (ngày)

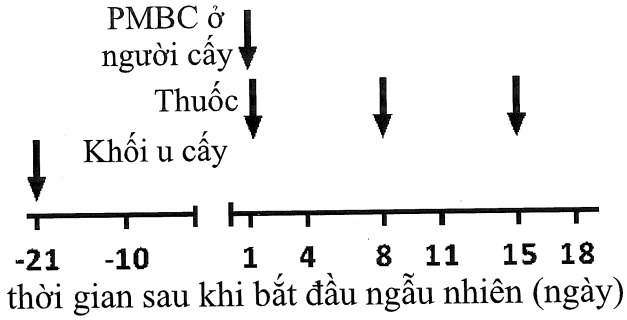
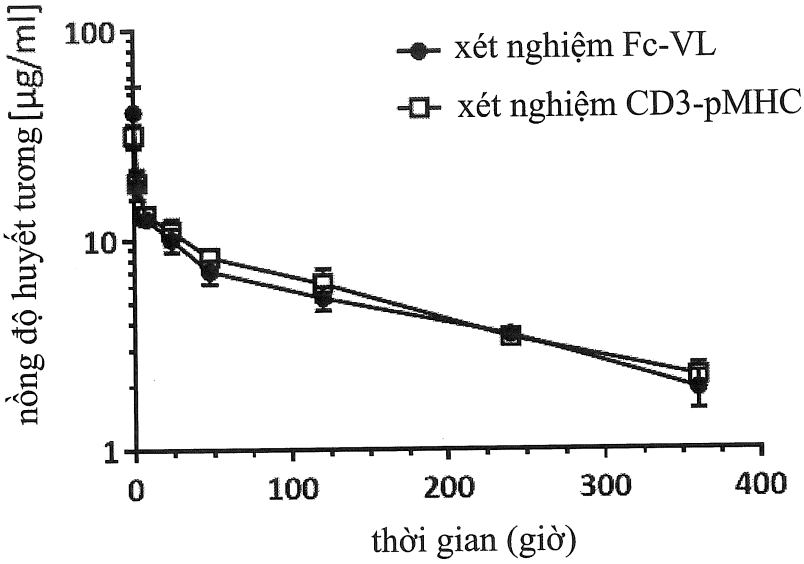
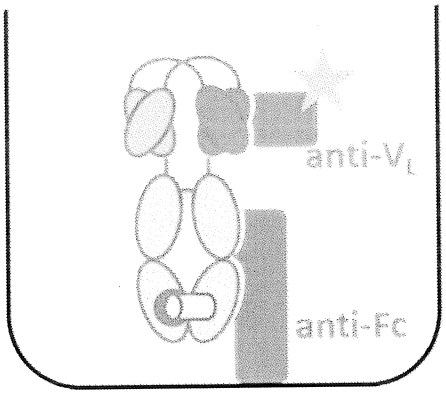

PMBC ở người cấy
Thuốc
Khối u cấy
-21
-10
1
4
8
11
15
18
thời gian sau khi bắt đầu ngẫu nhiên (ngày)

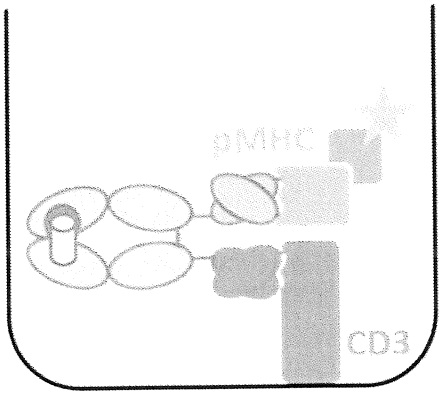
Fig.13





xét nghiệm Fc-VL

phát hiện các đơn vị con TCER



xét nghiệm CD3-pMHC

phát hiện các liên kết chức năng kép

Fig.14

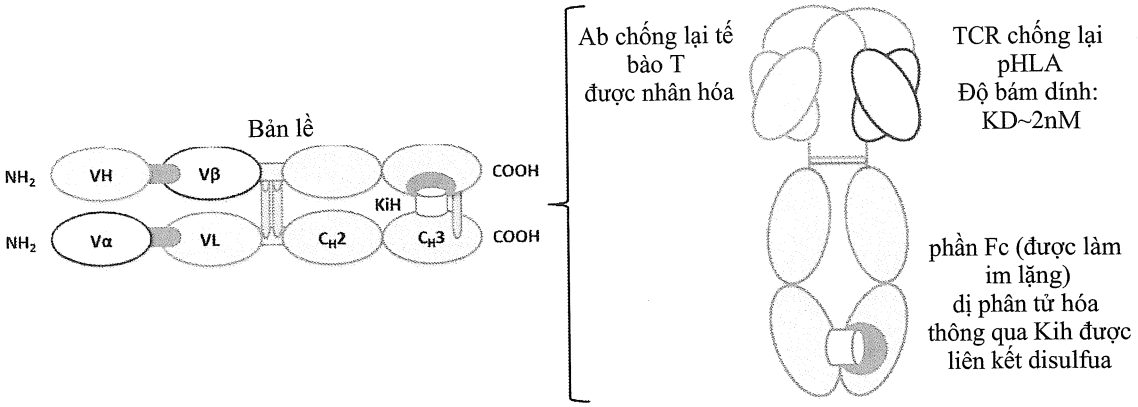

Bản lề
NH2
VH
Vβ
KiH
COOH
NH2
Vα
VL
CH2
CH3
COOH
Ab chống lại tế bào T được nhân hóa
TCR chống lại pHLA Độ bám dính: KD~2nM
phần Fc (được làm im lặng) dị phân tử hóa thông qua Kih được liên kết disulfua

Fig.15

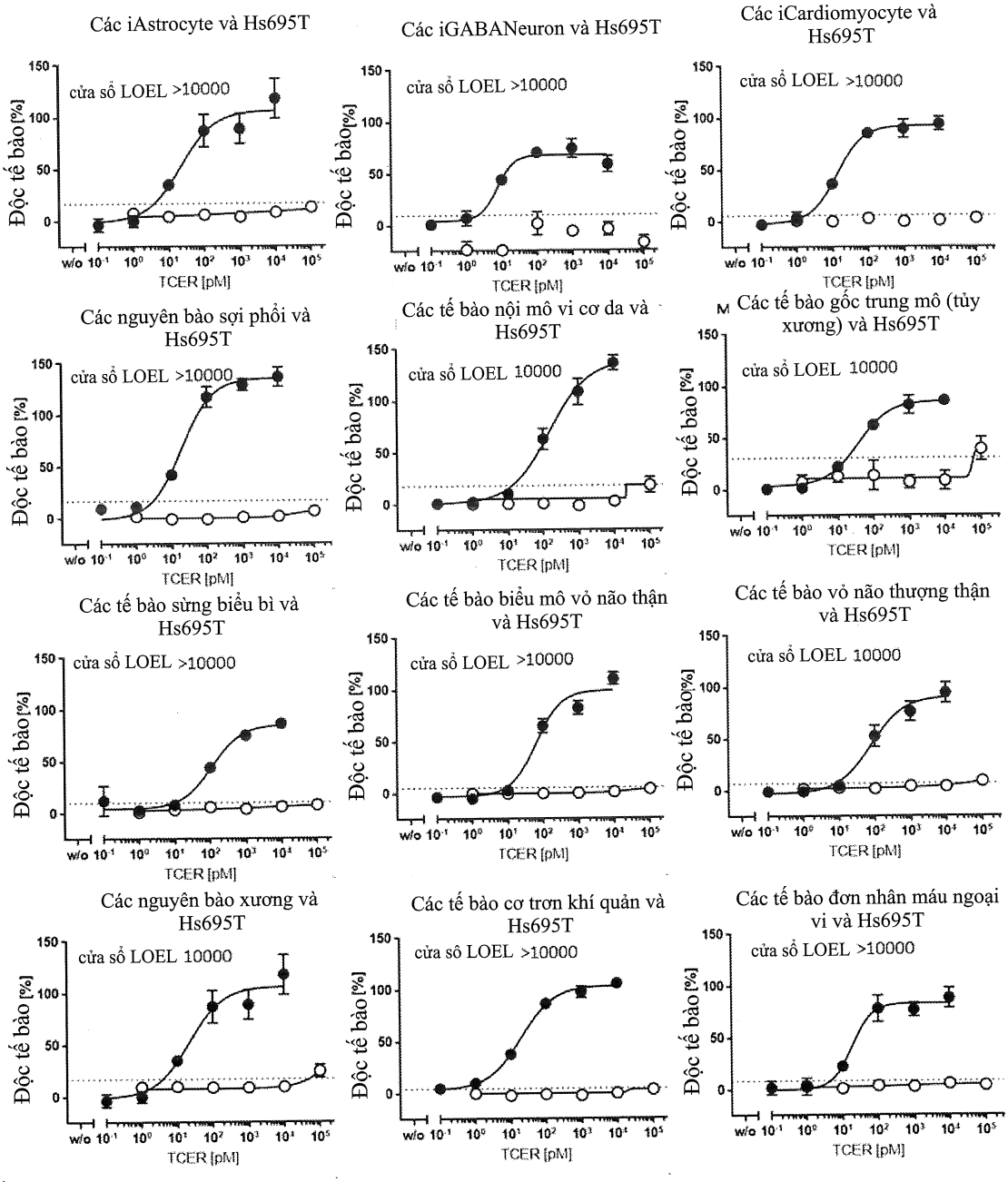

Các iAstrocyte và Hs695T
Các iGABANeuron và Hs695T
Các iCardiomyocyte và Hs695T
Các nguyên bào sợi phổi và Hs695T
Các tế bào nội mô vi cơ da và Hs695T
Các tế bào gốc trung mô (tủy xương) và Hs695T
Các tế bào sừng biểu bì và Hs695T
Các tế bào biểu mô vỏ não thận và Hs695T
Các tế bào vỏ não thượng thận và Hs695T
Các nguyên bào xương và Hs695T
Các tế bào cơ trơn khí quản và Hs695T
Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi và Hs695T
cửa sổ LOEL >10000
cửa sổ LOEL 10000
Độc tế bào [%]
TCER [pM]
TCER trên Hs695T
TCER trên tế bào bình thường
ngưỡng LOEL

Fig.16

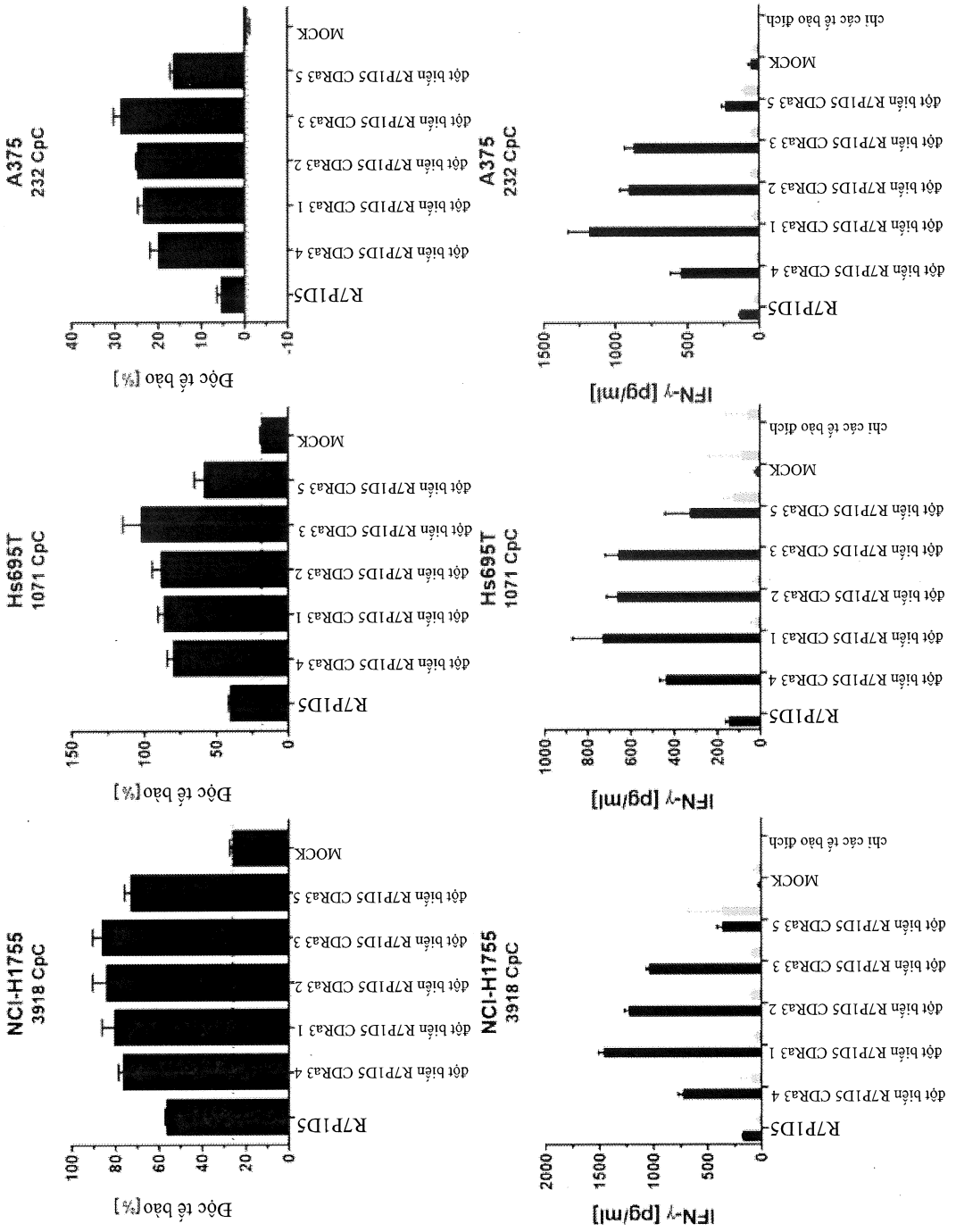

NCI-H1755
3918 CpC
Độc tế bào [%]
R7P1D5
dột biến R7P1D5 CDRa3 4
dột biến R7P1D5 CDRa3 1
dột biến R7P1D5 CDRa3 2
dột biến R7P1D5 CDRa3 3
dột biến R7P1D5 CDRa3 5
MOCK
IFN-γ [pg/ml]
chỉ các tế bào đích
Hs695T
1071 CpC
A375
232 CpC

Fig.17

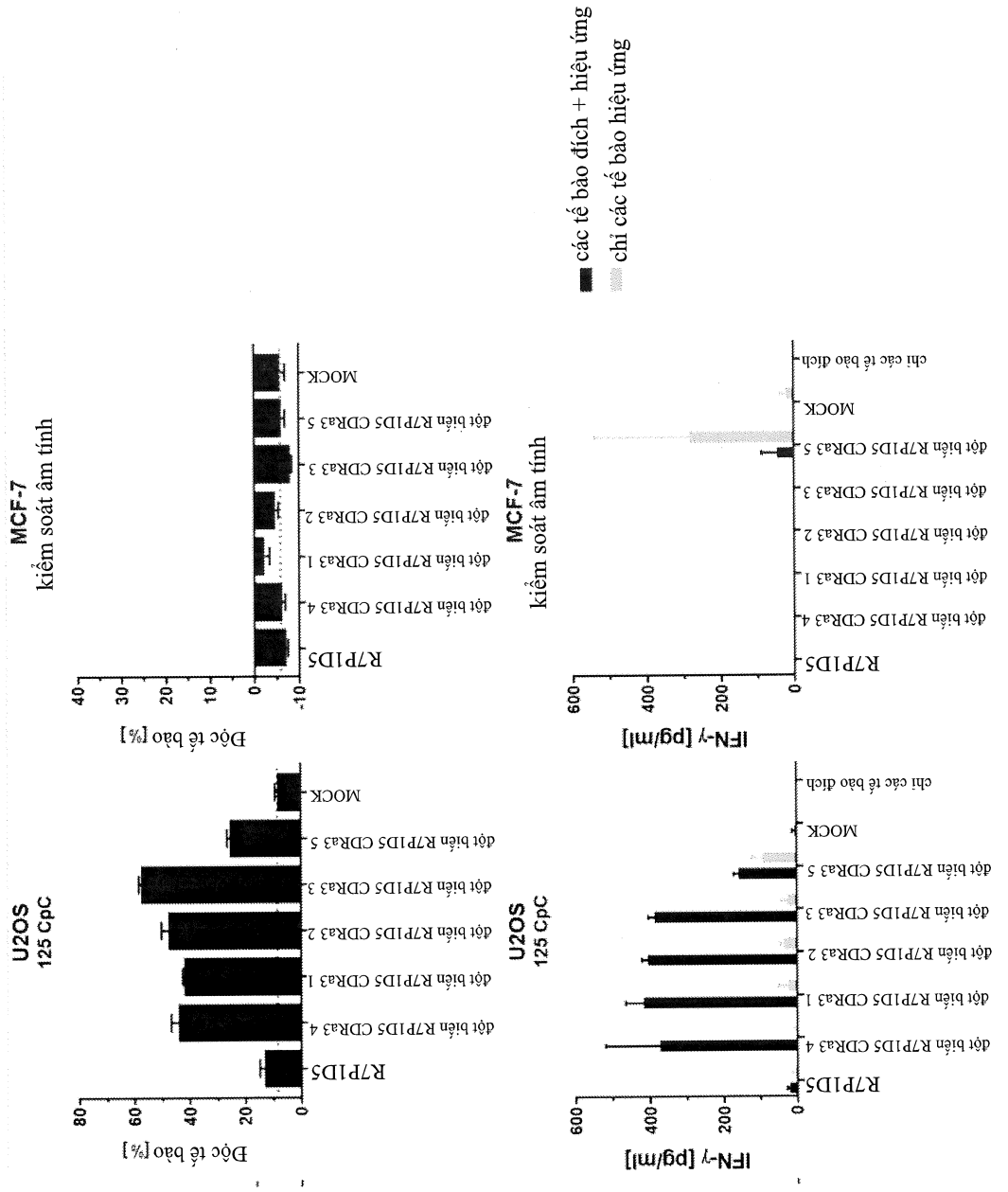


Fig.17 (tiếp tục)

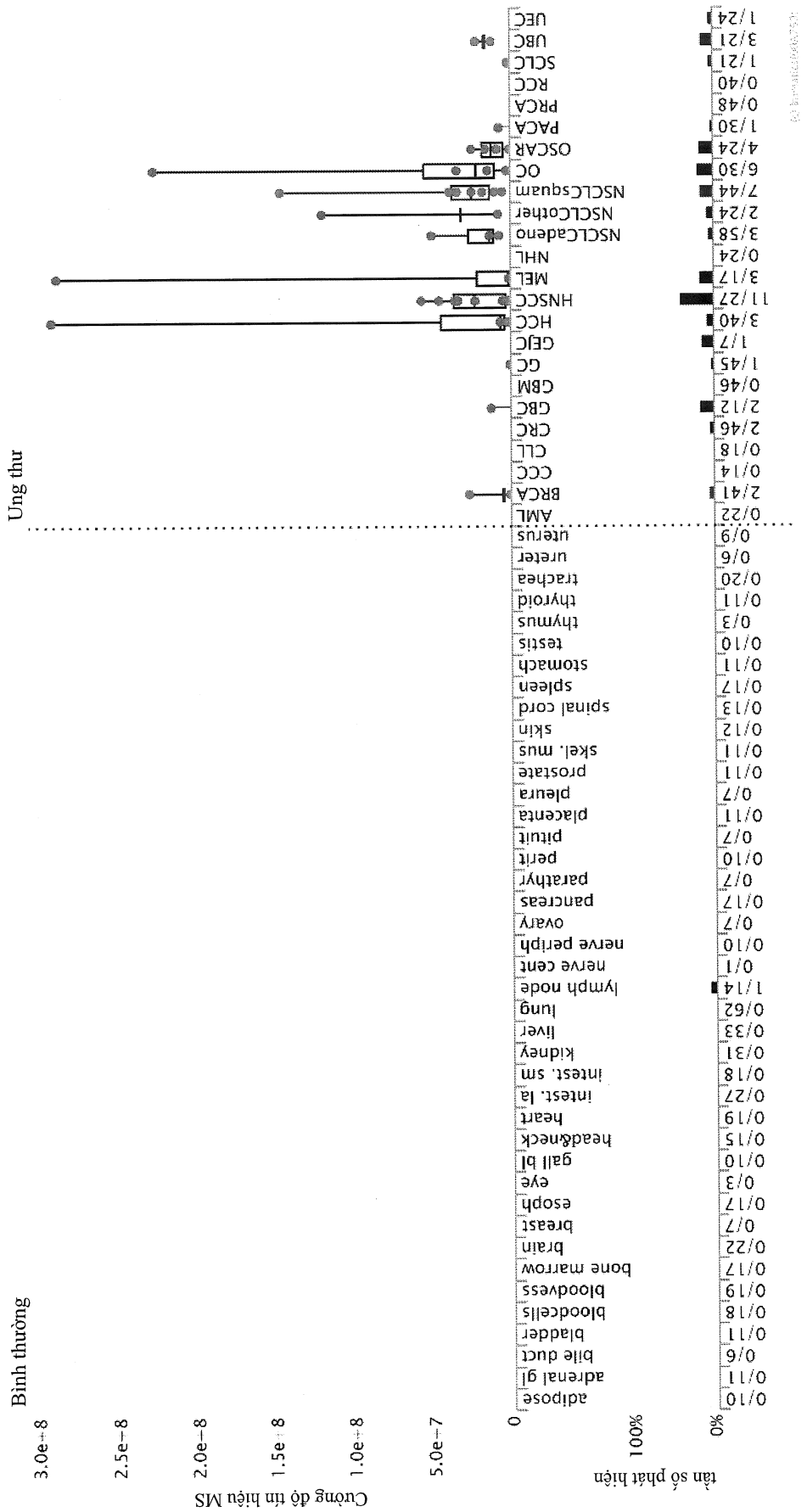

Bình thường
Ung thư
Cường độ tín hiệu MS
tần số phát hiện
adipose
adrenal gl
bile duct
bladder
bloodcells
bloodvess
bone marrow
brain
breast
esoph
eye
gall bl
head&neck
heart
intest. la
intest. sm
kidney
liver
lung
lymph node
nerve cent
nerve periph
ovary
pancreas
parathyr
perit
pituit
placenta
pleura
prostate
skel. mus
skin
spinal cord
spleen
stomach
testis
thymus
thyroid
trachea
ureter
uterus
AML
BRCA
CCC
CLL
CRC
GBC
GBM
GC
GEJC
HCC
HNSCC
MEL
NHL
NSCLCadeno
NSCLCother
NSCLCsquam
OC
OSCAR
PACA
PRCA
RCC
SCLC
UBC
UEC
0/10
0/11
0/6
0/11
0/18
0/19
0/17
0/22
0/7
0/17
0/3
0/10
0/15
0/19
0/27
0/18
0/31
0/33
0/62
1/14
0/1
0/10
0/7
0/17
0/7
0/10
0/7
0/11
0/7
0/11
0/12
0/13
0/17
0/11
0/10
0/3
0/11
0/20
0/6
0/9
2/41
0/14
0/18
2/46
2/12
0/46
1/45
1/7
3/40
11/27
3/17
0/24
3/58
2/24
7/44
6/30
4/24
1/30
0/48
0/40
1/21
3/21
1/24
3.0e+8
2.5e−8
2.0e−8
1.5e−8
1.0e−8
5.0e−7
0
100%
0%

Fig.18

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Protein liên kết kháng nguyên và dược phẩm bao gồm protein này

<130> 1017-18 PCT

<150> US 62/882,131
<151> 2019-08-02

<150> US 62/905,782
<151> 2019-09-25

<150> DE 10 2019 121 007.0
<151> 2019-08-02

<160> 182

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit MAG-003

<400> 1

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5

<210> 2
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi alpha R7P1D5 TCR có chiều dài đầy đủ

<400> 2

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu

100 105 110

Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser
115 120 125

Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự dẫn đầu alpha R7P1D5

<400> 3

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg
20

<210> 4
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi alpha R7P1D5

<400> 4

Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp
1 5 10 15

Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu
20 25 30

Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu
50 55 60

Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser
85 90 95

Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105 110

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 CDRa1

<400> 5

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 CDRa2

<400> 6

Ile Phe Ser Asn Met Asp Met
1 5

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 CDRa3

<400> 7

Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 8
<211> 141
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền hằng định alpha R7P1D5

<400> 8

Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135 140

<210> 9
<211> 310
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi beta R7P1D5 TCR chiều dài đầy đủ

<400> 9

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

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr
20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His
35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu
50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro
65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305 310

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự dẫn đầu beta R7P1D5

<400> 10

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

Lys His Thr

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi R7P1D5

<400> 11

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly

1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln
65 70 75 80

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

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 CDRb1

<400> 12

Ser Gly His Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 CDRb2

<400> 13

Phe Asn Asn Asn Val Pro
1 5

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 CDRb3

<400> 14

Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe
1 5 10

<210> 15
<211> 179
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền hằng định beta R7P1D5

<400> 15

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

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

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65 70 75 80

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

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
100 105 110

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

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 16
<211> 370
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Aga2p-R7P1D5

<400> 16

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
65 70 75 80

Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp
85 90 95

Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Ala Ser Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser
100 105 110

Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr
115 120 125

Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro
130 135 140

Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met
145 150 155 160

Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His
165 170 175

Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr
180 185 190

Phe Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly
195 200 205

Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly
245 250 255

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu
260 265 270

Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr
275 280 285

Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg
290 295 300

Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln
305 310 315 320

Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala
325 330 335

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
340 345 350

Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
355 360 365

Asp Leu
370

<210> 17
<211> 87

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự dẫn đầu và Aga2p

<400> 17

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
65 70 75 80

Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe
85

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

<220>
<223> Thẻ FLAG cộng với trình tự liên kết

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser

<210> 19
<211> 247
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi chuỗi đơn của R7P1D5 với trình tự liên kết

<400> 19

Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp
1 5 10 15

Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu
20 25 30

Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu
50 55 60

Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser
85 90 95

Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg
130 135 140

His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro
145 150 155 160

Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg
165 170 175

Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp
180 185 190

Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser
195 200 205

Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu
225 230 235 240

Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
245

<210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết và thẻ Myc

<400> 20

Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa2 đột biến 1 (aF57Y)

<400> 21

Ile Tyr Ser Asn Met Asp Met
1 5

<210> 22
<211> 247
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> scTv R7P1D5S (phiên bản ổn định của scTv R7P1D5)

<400> 22

Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp
1 5 10 15

Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu
20 25 30

Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu
50 55 60

Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser
85 90 95

Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg
130 135 140

His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro
145 150 155 160

Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg
165 170 175

Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp
180 185 190

Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser
195 200 205

Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu
225 230 235 240

Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
245

<210> 23
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> RABGAP1L-001

<400> 23

Phe Leu Leu Glu Thr Val Val Arg Val
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> AXIN1-001

<400> 24

Ile Leu Asp Glu His Val Gln Arg Val
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ANO5-001

<400> 25

Ile Val Met Glu His Val Val Phe Leu
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> TPX2-001

<400> 26

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SYNE3-001

<400> 27

Lys Leu Leu Asp Leu Gln Val Arg Val
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MIA3-001

<400> 28

Lys Val Leu Asp Lys Val Phe Arg Ala
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HERC4-001

<400> 29

Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PSME2-001

<400> 30

Lys Val Leu Glu Arg Val Asn Ala Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HEATR5A-001

<400> 31

Lys Val Leu Glu Thr Leu Val Thr Val
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CNOT1-003

<400> 32

Lys Val Leu Gly Ile Val Val Gly Val

1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> TEP1-003

<400> 33

Ala Val Glu Glu His Val Val Ser Val
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PITPNM3-001

<400> 34

Ser Val Leu Glu Lys Val Thr Arg Ala
1 5

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa3 đột biến 1

<400> 35

Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa3 đột biến 2

<400> 36

Cys Ala Glu Phe Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa3 đột biến 3

<400> 37

Cys Ala Glu Phe Asn Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa3 đột biến 4

<400> 38

Cys Ala Glu Phe Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa3 đột biến 5

<400> 39

Cys Ala Glu Ala Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 40
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 1

<400> 40

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Met Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser
115 120 125

Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 41
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 2

<400> 41

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Phe Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser
115 120 125

Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 42
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 3

<400> 42

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Phe Asn Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser
115 120 125

Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 43
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 4

<400> 43

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Phe Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser
115 120 125

Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 44
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5 - biến thể chuỗi alpha 5

<400> 44

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Ala Thr Ser Glu Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser
115 120 125

Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> NYESO1-001

<400> 45

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A1

<400> 46

Ala Val Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A2

<400> 47

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A3

<400> 48

Lys Val Ala Glu His Val Val Arg Val
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A4

<400> 49

Lys Val Leu Ala His Val Val Arg Val
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A5

<400> 50

Lys Val Leu Glu Ala Val Val Arg Val
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A6

<400> 51

Lys Val Leu Glu His Ala Val Arg Val
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A7

<400> 52

Lys Val Leu Glu His Val Ala Arg Val
1 5

<210> 53
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A8

<400> 53

Lys Val Leu Glu His Val Val Ala Val
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAG-003_A9

<400> 54

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ala
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa1 đột biến 1 (tương đương đột biến aD27E)

<400> 55

Glu Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa2 đột biến 2 (tương đương đột biến 5 CDRa2 + đột biến aS65Q)

<400> 56

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa2 đột biến 3

<400> 57

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Val
1 5

<210> 58
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#1

<400> 58

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa2 đột biến 4

<400> 59

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser
1 5

<210> 60
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#20

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
            260                 265                 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
    290                 295                 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305                 310                 315                 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
                325                 330                 335
```

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 61
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#21

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb1 đột biến 1

<400> 62

Pro Gly His Asp Tyr
1 5

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 đột biến 1

<400> 63

Phe Cys Tyr Gly His Pro
1 5

<210> 64
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 đột biến 2

<400> 64

Phe Cys Tyr Gly Val Pro
1 5

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 đột biến 3

<400> 65

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro
1 5

<210> 66
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 đột biến 4

<400> 66

Phe Cys Tyr Gly Ala Pro
1 5

<210> 67
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#29

<400> 67

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 68
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#30

<400> 68

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 69
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#31

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 đột biến 5

<400> 70

Phe Cys Tyr Gly Met Pro
1 5

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb3 đột biến 1 (bN109D)

<400> 71

Cys Ala Ser Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe
1 5 10

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa1 liên ứng - ACT + TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (1)..(1)
<223> trong đó Xaa là một axit amin bất kỳ, tốt hơn là D hoặc E, tốt hơn nữa là E

<400> 72

Xaa Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa2 liên ứng - ACT + TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (2)..(2)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là F hoặc Y, tốt hơn nữa là Y

<220>

<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (4)..(4)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là N hoặc S, tốt hơn nữa là S

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (5)..(5)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Q hoặc M, tốt hơn nữa là Q

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (7)..(7)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là M, V, S hoặc Q, tốt hơn là S hoặc Q, tốt hơn nữa là Q

<400> 73

Ile Xaa Ser Xaa Xaa Asp Xaa
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRa2 liên ứng p1 - TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Q, V hoặc S, tốt hơn là Q

<400> 74

Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Xaa
1 5

<210> 75
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 75-NU(17)-R7P1D5#32

<400> 75

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly

405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 76
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5#2-chuỗi nặng

<400> 76

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDRa3 liên ứng ACT + TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (4)..(4)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là A, F hoặc M, tốt hơn nữa là M

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (5)..(5)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là S, T, hoặc N, tốt hơn nữa là T

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (7)..(7)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là E hoặc A, tốt hơn là E

<400> 77

Cys Ala Glu Xaa Xaa Ser Xaa Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb1 liên ứng - ACT + TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là P, S, tốt hơn nữa là P

<400> 78

Xaa Gly His Asp Tyr
1 5

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 liên ứng - ACT + TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (2)..(2)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là C hoặc N, tốt hơn nữa là C

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (3)..(3)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là Y hoặc N, tốt hơn nữa là Y

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (4)..(4)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là G hoặc N, tốt hơn nữa là G

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (5)..(5)
<223> trong đó Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là Xaa là H, V, T, A hoặc M, tốt hơn là H hoặc T, tốt nhất là T

<400> 79

Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
1 5

<210> 80
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(17)-R7P1D5x- chuỗi nhẹ thông thường

<400> 80

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 81
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb2 liên ứng p3 - TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là H,T, tốt hơn nữa là T

<400> 81

Phe Cys Tyr Gly Xaa Pro
1 5

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRb3 liên ứng ACT + TCER

<220>
<221> Dấu hiệu khác biệt
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ, tốt hơn là N,D, tốt hơn là D

<400> 82

Cys Ala Ser Arg Ala Xaa Thr Gly Glu Leu Phe Phe
1 5 10

<210> 83
<211> 24
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-a

<400> 83

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr
20

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-a

<400> 84

Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr
1 5 10 15

Tyr

<210> 85
<211> 33
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-a

<400> 85

Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His
1 5 10 15

Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr
20 25 30

Phe

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-a

<400> 86

Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
1 5 10

<210> 87
<211> 26
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-b

<400> 87

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly
1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile
20 25

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-b

<400> 88

Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 89
<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-b

<400> 89

Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro
1 5 10 15

Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp
20 25 30

Ser Ala Val Tyr Phe
35

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-b

<400> 90

Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
1 5

<210> 91
<211> 24
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-a(19V)

<400> 91

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr
20

<210> 92
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-a (48K)

<400> 92

Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Gln Leu Leu Thr
1 5 10 15

Tyr

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-b (54F)

<400> 93

Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 94
<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-b (66C)

<400> 94

Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro
1 5 10 15

Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp
20 25 30

Ser Ala Val Tyr Phe
35

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MUM-001

<400> 95

Lys Leu Val Glu Tyr Ile Val Lys Ala
1 5

<210> 96
<211> 8

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 96

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 97
<211> 317
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAGA4 (P43358)

<400> 97

Met Ser Ser Glu Gln Lys Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Val
1 5 10 15

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

Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Pro
35 40 45

Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Ala Gly Pro Pro Gln
50 55 60

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

Trp Arg Gln Pro Asn Glu Gly Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu Gly Pro
85 90 95

Ser Thr Ser Pro Asp Ala Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ala Leu Ser Asn
100 105 110

Lys Val Asp Glu Leu Ala His Phe Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Lys
115 120 125

Glu Leu Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Arg Val Ile Lys Asn Tyr
130 135 140

Lys Arg Cys Phe Pro Val Ile Phe Gly Lys Ala Ser Glu Ser Leu Lys
145 150 155 160

Met Ile Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr
165 170 175

Tyr Thr Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly
180 185 190

Asn Asn Gln Ile Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Gly
195 200 205

Thr Ile Ala Met Glu Gly Asp Ser Ala Ser Glu Glu Glu Ile Trp Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Val Met Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val Tyr
225 230 235 240

Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Trp Val Gln Glu Asn Tyr
245 250 255

Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asn Pro Ala Arg Tyr Glu Phe
260 265 270

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

Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ala Tyr Pro Ser
290 295 300

Leu Arg Glu Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val
305 310 315

<210> 98
<211> 318
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MAGA8 (P43361)

<400> 98

Met Leu Leu Gly Gln Lys Ser Gln Arg Tyr Lys Ala Glu Glu Gly Leu
1 5 10 15

Gln Ala Gln Gly Glu Ala Pro Gly Leu Met Asp Val Gln Ile Pro Thr
20 25 30

Ala Glu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Ile Met Gly
35 40 45

Thr Leu Glu Glu Val Thr Asp Ser Gly Ser Pro Ser Pro Pro Gln Ser
50 55 60

Pro Glu Gly Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Thr Asp Ser Thr Leu Trp
65 70 75 80

Ser Gln Ser Asp Glu Gly Ser Ser Ser Asn Glu Glu Glu Gly Pro Ser
85 90 95

Thr Ser Pro Asp Pro Ala His Leu Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ala Leu
100 105 110

Asp Glu Lys Val Ala Glu Leu Val Arg Phe Leu Leu Arg Lys Tyr Gln
115 120 125

Ile Lys Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Ser Val Ile Lys
130 135 140

Asn Tyr Lys Asn His Phe Pro Asp Ile Phe Ser Lys Ala Ser Glu Cys
145 150 155 160

Met Gln Val Ile Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Val Asp Pro Ala Gly
165 170 175

His Ser Tyr Ile Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu
180 185 190

Leu Gly Asp Asp Gln Ser Thr Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
195 200 205

Leu Gly Met Ile Leu Met Glu Gly Ser Arg Ala Pro Glu Glu Ala Ile
210 215 220

Trp Glu Ala Leu Ser Val Met Gly Leu Tyr Asp Gly Arg Glu His Ser
225 230 235 240

Val Tyr Trp Lys Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gln Glu Trp Val Gln Glu
245 250 255

Asn Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Ser Asp Pro Val Arg Tyr
260 265 270

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

Val Leu Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ser Tyr
290 295 300

Pro Ser Leu His Glu Glu Ala Leu Gly Glu Glu Lys Gly Val
305 310 315

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 99

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 100

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> GGGGS

<400> 101

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 102

Thr Val Leu Arg Thr
1 5

<210> 103
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 103

Thr Val Ser Ser Ala Ser
1 5

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 104

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

<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 105

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
1 5

<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 106

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 107
<211> 27
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 107

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

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

<210> 108
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 108

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 109

Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
1 5

<210> 110
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 110

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> 111
<211> 232
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin Fc nguyên bản của IGHG1*01

<400> 111

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 112
<211> 229
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc đột biến với núm [S354C và T366W] +

<400> 112

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

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

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

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

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

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

Leu Ser Leu Ser Pro
225

<210> 113
<211> 229
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc với đột biến lỗ [(Y349C, T366S, L368A và Y407V] +

<400> 113

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

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

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

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

Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

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

Leu Ser Leu Ser Pro
225

<210> 114
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bản lề IgG1

<400> 114

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

Pro Glu Leu Leu Gly
20

<210> 115
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bản lề IG2

<400> 115

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 116
<211> 53
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bản lề IG3

<400> 116

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

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
35 40 45

Pro Glu Leu Leu Gly
50

<210> 117
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bản lề IG4

<400> 117

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 118
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5_aMTSE

<400> 118

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 119
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5_aFTSE

<400> 119

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Phe Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 120
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5_aFNSE

<400> 120

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile

35 40 45

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Phe Asn Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 121
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5_aFSSA

<400> 121

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Phe Ser Ser Ala Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 122
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5_aATSE

<400> 122

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Ala Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 123
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU (V9) chuỗi nhẹ cho CR7P1D5S

<400> 123

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 124
<211> 487
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(V9)-CR7P1D5S (HC)

<400> 124

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp
245 250 255

Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu
260 265 270

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

Ile Tyr Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu
290 295 300

Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln
305 310 315 320

Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser
325 330 335

Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg
370 375 380

His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro
385 390 395 400

Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg
405 410 415

Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp
420 425 430

Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser
435 440 445

Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu
465 470 475 480

Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 125
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(Var17)-CR7P1D5#19 (HC)

<400> 125

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
245 250 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
260 265 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
290 295 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305 310 315 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
325 330 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
370 375 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385 390 395 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met
405 410 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp
420 425 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
435 440 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465 470 475 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
485

<210> 126
<211> 488
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 75-NU(Var17)-CR7P1D5I (HC)

<400> 126

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

```
            180                 185                 190

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

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

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

Gly Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Ala Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
            260                 265                 270

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

Tyr Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val
    290                 295                 300

Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr
305                 310                 315                 320

Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu
                325                 330                 335

Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly
            340                 345                 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        355                 360                 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro
    370                 375                 380

Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys
385                 390                 395                 400

Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met
                405                 410                 415

Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp
            420                 425                 430

Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala
        435                 440                 445

Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala
    450                 455                 460

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly
465                 470                 475                 480

Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
                485
```

<210> 127
<211> 453
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso0-dSFcKO-GK (polypeptit thứ nhất (alpha-VL))

<400> 127

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 128
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V17)-R7P1D5#112-dsFcKO-GK (VH-beta)

<400> 128

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ZFC-001

<400> 129

Lys Leu Gln Glu Gln Ile His Arg Val
1 5

<210> 130
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)

<400> 130

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 131
<211> 453
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso1-dsFcKO-GK (alpha-VL)

<400> 131

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 132
<211> 274
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi alpha 1G4

<400> 132

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp
1 5 10 15

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

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

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

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg
65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile
85 90 95

Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg
100 105 110

Pro Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser
115 120 125

Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
130 135 140

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

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
260 265 270

Ser Ser

<210> 133
<211> 453
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso2-dsFcKO-GK (alpha-VL)

<400> 133

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 134
<211> 311

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi beta 1G4

<400> 134

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
35 40 45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
50 55 60

Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
65 70 75 80

Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
85 90 95

Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
100 105 110

Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg
115 120 125

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

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
145 150 155 160

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
165 170 175

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
180 185 190

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
195 200 205

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
210 215 220

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
225 230 235 240

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
245 250 255

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln
260 265 270

Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
275 280 285

Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val

290 295 300

Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305 310

<210> 135
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso0-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 135

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
130 135 140

Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys
165 170 175

Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser
180 185 190

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe
210 215 220

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro
465

<210> 136
<211> 455
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VL-beta)

<400> 136

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

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

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
130 135 140

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
145 150 155 160

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
165 170 175

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
180 185 190

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
195 200 205

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
210 215 220

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

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

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

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 137
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114_iso1-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 137

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
130 135 140

Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys
165 170 175

Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser
180 185 190

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe

210 215 220

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro
465

<210> 138
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5# 114-iso0-Valpha

<400> 138

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Ser Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 139
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114_iso2-dsFcKO-GK (alpha-VH)

<400> 139

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
115 120 125

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
130 135 140

Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys
165 170 175

Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser
180 185 190

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe
210 215 220

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro
465

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 140

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 141

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

<210> 142
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V23)-R7P1D5#114_dsFcKO-GK (VH-beta)

<400> 142

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 143
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 143

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

<210> 144
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 144

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly
20

<210> 145
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 145

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25

<210> 146
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 146

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 147
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 147

Gly Gly Gln Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Gly Gly Gln Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Thr Gly Ser Gly Gly Gln Gly Ser
20 25

<210> 148
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 148

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr
1 5

<210> 149
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5#112-Vbeta

<400> 149

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly
1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe Tyr
35 40 45

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln
65 70 75 80

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

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 150
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5#114 VBETA

<400> 150

Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly
1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp Tyr Leu
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Phe Tyr
35 40 45

Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln
65 70 75 80

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

Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 151
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5#114-iso1-Valpha

<400> 151

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 152
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R7P1D5#114-iso2-Valpha100

<400> 152

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Glu Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr

20 25 30

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

Tyr Ser Ser Gln Asp Gln Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Met Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro
100 105

<210> 153
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> UCHT1(V17) VL

<400> 153

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 154
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> UCHT1(V17) VH

<400> 154

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 155
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 155

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

<210> 156
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> UCHT1(23) VH

<400> 156

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 157
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> BMA(10) VL

<400> 157

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 158
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> BMA(10) VH

<400> 158

Glu 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 Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val 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 Val Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser 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 His Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 159
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> BMA(36) VL

<400> 159

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 160
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> BMA(36)- VH

<400> 160

Glu 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 Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val 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 Val Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser 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 His Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 161
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 161

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr

<210> 162
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> UCHT1(17opt) VH

<400> 162

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 163
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên kết

<400> 163

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Thr
20

<210> 164
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> UCHT1(21) VH

<400> 164

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 165
<211> 27
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên kết

<400> 165

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr
20 25

<210> 166
<211> 471
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V21)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)

<400> 166

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 167
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(V17opt)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)

<400> 167

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Glu Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu
130 135 140

Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Pro Gly His Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu
165 170 175

Phe Tyr Phe Cys Tyr Gly Thr Pro Cys Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys
195 200 205

Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser
210 215 220

Arg Ala Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PRAME-004

<400> 168

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
1 5

<210> 169
<211> 461
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (alpha-VL)

<400> 169

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20 25 30

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

Ser Ile Tyr Gln Glu Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

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

Gln Gly Gly Ile Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile
100 105 110

Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Gln
115 120 125

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
130 135 140

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
165 170 175

Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
195 200 205

Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Gln Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

<210> 170
<211> 477
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (VH-beta)

<400> 170

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr
130 135 140

Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Pro Gly His Arg
145 150 155 160

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

Phe Glu Tyr Val His Gly Glu Glu Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Ser Ser Glu Met Asn Ile
195 200 205

Ser Asn Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
210 215 220

Pro Trp Asp Ser Pro Asn Val Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
225 230 235 240

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
245 250 255

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305 310 315 320

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

325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470 475

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 171

Lys Leu Leu Asp Leu Met Pro Arg Leu
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 172

Lys Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Arg Leu
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 173

Ser Ile Ile Gly Arg Leu Leu Glu Val
1 5

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 174

Lys Ile Tyr Glu Gly Gln Val Glu Val
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 175

Ile Leu Leu Glu His Asn Tyr Ala Leu
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 176

Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Lys Leu
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 177

Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala Ala Val
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 178

Ile Leu Asp Gln Lys Ile Asn Glu Val
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 179

Lys Leu Leu Pro Tyr Ile Val Gly Val
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 180

Lys Leu Gly Ser Val Pro Val Thr Val
1 5

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 181

Lys Leu Phe Gly His Leu Thr Ser Ala
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 182

Lys Thr Leu Ser Ala Ile Leu Arg Ile
1 5