



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0051420

(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61P 35/00; C07K 16/32; (13) B
A61K 39/00; A61P 37/04

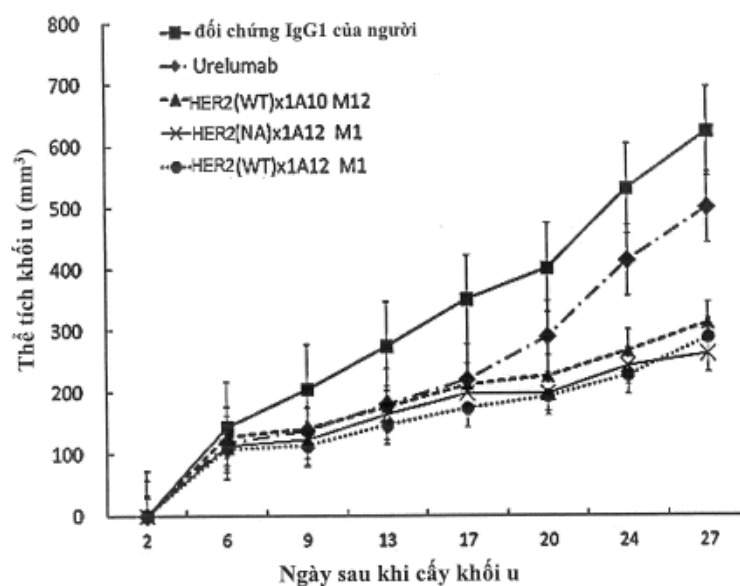
-
- (21) 1-2022-00208 (22) 27/07/2020
(86) PCT/KR2020/009871 27/07/2020 (87) WO 2021/020846 04/02/2021
(30) 62/878,951 26/07/2019 US; 63/024,608 14/05/2020 US
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/08/2022 413A
(73) YUHAN CORPORATION (KR)
74, Noryangjin-ro, Dongjak-gu, Seoul 06927, Republic of Korea
(72) CHUNG, Hyejin (KR); YONG, Yeryoung (KR); PARK, Kyeongsu (KR); PARK,
Eunyoung (KR); JUNG, Ui-Jung (KR); LEE, Yangsoon (KR); KIM, Eunjung (KR);
SON, Yong-Gyu (KR); SON, Wonjun (KR); AHN, Seawon (KR); YEOM,
Donghoon (KR); LEE, Chanmoo (KR); HONG, Junghyeon (KR); SONG, Moo
Young (KR); LEE, Eun-Jung (KR); LEE, Na Rae (KR); PARK, Young Bong (KR);
LEE, Eun-Jung (KR); KIM, Taewang (KR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG 4-1BB/KHÁNG HER2 VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-00208

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2, và được phẩm và phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư sử dụng kháng thể này.

Fig. 10



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2, và được phẩm và phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein 4-1BB là thành viên của siêu họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u (TNF) (TNF-receptor superfamily - TNFRSF) và là phân tử đồng kích thích mà được biểu hiện theo sau quá trình hoạt hóa của tế bào miễn dịch, cả tế bào miễn dịch bẩm sinh và thích ứng. 4-1BB đóng vai trò quan trọng trong việc điều biến hoạt tính của các tế bào miễn dịch. Chất chủ vận 4-1BB tăng cường sự tăng sinh và sống sót của tế bào miễn dịch, tiết cytokin, và hoạt tính tiêu tế bào của tế bào T CD8. Nhiều nghiên cứu khác thể hiện rằng sự hoạt hóa 4-1BB tăng cường đáp ứng miễn dịch để loại bỏ khối u ở chuột nhắt. Do đó, đề xuất rằng 4-1BB là phân tử đích đầy hứa hẹn trong miễn dịch học ung thư. Mặc cho hiệu lực kháng khối u của nó, kháng thể kháng 4-1BB gây ra độc tính mạnh đối với gan trong các ứng dụng lâm sàng.

Protein HER2 là thành viên của họ thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (epidermal growth factor receptor - EGFR) và tham gia vào nhiều cơ chế liên quan đến khối u. HER2 là thụ thể tyrosin kinaza (receptor tyrosine kinase - RTK) điển hình trình diện trên bề mặt của tế bào, và nhờ đó cảm ứng sự tăng sinh và sự xâm nhập của tế bào ung thư, sự hình thành mạch, v.v..

Trong khi đó, nhiều loại và dạng khác nhau của kháng thể đa đặc hiệu nhắm đích hai hoặc nhiều kháng nguyên đã được phát triển và được mong đợi làm kháng thể thuốc mới có tác dụng trị liệu tốt so với kháng thể đơn dòng.

Do đó, cần phát triển kháng thể đa đặc hiệu có khả năng nhận biết hai kháng nguyên khác nhau trong đó một kháng nguyên trình diện trên tế bào ung thư và kháng nguyên khác trình diện trên tế bào khác chẳng hạn như tế bào miễn dịch, cho liệu pháp ung thư có hiệu quả hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2, chứa:

(1) kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích HER2, mà có khả năng nhận biết và/hoặc liên kết đặc hiệu với protein HER2; và

(2) kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích 4-1BB, mà có khả năng nhận biết và/hoặc liên kết đặc hiệu với protein 4-1BB.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép. Dược phẩm này còn có thể chứa chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư và/hoặc để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư và/hoặc để tăng cường đáp ứng miễn dịch, dược phẩm này chứa kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng có tác dụng dược của kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm cho đối tượng. Phương pháp còn có thể bao gồm bước nhận biết đối tượng cần điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, trước bước dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng có tác dụng dược của kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm cho đối tượng. Phương pháp còn có thể bao gồm bước nhận biết đối tượng cần tăng cường đáp ứng miễn dịch, trước bước dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép trong bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép trong bào chế thuốc để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit. Vector tái tổ hợp có thể được sử dụng làm vector biểu hiện của polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép. Tế bào có thể là tế bào tái tổ hợp được chuyển nhiễm với vector tái tổ hợp chứa polynucleotit.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể đặc hiệu kép, bao gồm bước biểu hiện polynucleotit ở tế bào. Bước biểu hiện polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy tế bào chứa polynucleotit (ví dụ, trong vector tái tổ hợp) trong điều kiện cho phép sự biểu hiện của polynucleotit.

Giải pháp kỹ thuật

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép, mỗi kháng thể này chứa kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor associated antigen - TAA; HER2) và kháng thể đặc hiệu với 4-1BB, và việc sử dụng chúng. Các kháng thể đặc hiệu kép này hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu 4-1BB và thúc đẩy mạnh tế bào miễn dịch chỉ khi có mặt tế bào biểu hiện HER2. Do đáp ứng miễn dịch trung gian bởi HER2 đặc hiệu, mong đợi là có độc tính đối với gan thấp hơn nhiều bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kép so với kháng thể đơn dòng 4-1BB.

Theo sáng chế, đề xuất kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2, và việc sử dụng chúng, trong đó kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 này có thể chứa:

(1) kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích HER2, mà có khả năng nhận biết và/hoặc liên kết đặc hiệu với protein HER2, và

(2) kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích 4-1BB, mà có khả năng nhận biết và/hoặc liên kết đặc hiệu với protein 4-1BB.

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép, mỗi chúng chứa kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA; HER2) và kháng thể đặc hiệu với 4-1BB, và việc sử dụng chúng. Các kháng thể đặc hiệu kép này hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu 4-1BB và thúc đẩy mạnh tế bào miễn dịch chỉ khi có mặt tế bào biểu hiện HER2. Do đáp ứng miễn dịch trung gian bởi HER2 đặc hiệu, mong đợi là có độc tính đối với gan thấp hơn nhiều bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kép so với kháng thể đơn dòng 4-1BB.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1a là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên (4-1BB của người) của kháng thể kháng 4-1BB được đo bằng phương pháp ELISA.

Fig. 1b là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết tế bào của kháng thể kháng 4-1BB được đo bằng phương pháp ELISA.

Fig. 2a là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên (HER2 của người) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được đo bằng phương pháp ELISA.

Fig. 2b là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên (HER2 của người) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được đo bằng phương pháp ELISA.

Fig. 3a là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên (4-1BB của người) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được đo bằng phương pháp ELISA.

Fig. 3b là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên (4-1BB của người) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được đo bằng phương pháp ELISA.

Fig. 4a là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào NCI-N87 (tế bào biểu hiện HER2 cao).

Fig. 4b là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào MDA-MB-231 (tế bào âm tính với HER2).

Fig. 5a là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào NCI-N87 biểu hiện HER2.

Fig. 5b là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào Calu-3 biểu hiện HER2.

Fig. 5c là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào HCC1954 biểu hiện HER2.

Fig. 5d là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào JIMT1 biểu hiện HER2.

Fig. 5e là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào ZR-75-1 biểu hiện HER2.

Fig. 5f là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào A431 không biểu hiện HER2.

Fig. 5g là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào MCF-7 không biểu hiện HER2.

Fig. 5h là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào MDA-MB231 không biểu hiện HER2.

Fig. 5i là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào BxPC-3 không biểu hiện HER2.

Fig. 6a là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào Calu-3 biểu hiện HER2.

Fig. 6b là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dòng tế bào HCC1954 biểu hiện HER2.

Fig. 7 là biểu đồ thể hiện tương quan giữa HER2 sABC (khả năng liên kết kháng thể riêng HER2) và sự truyền tín hiệu NF- κ B được cảm ứng bởi 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở nhiều dòng tế bào khác nhau.

Fig. 8a đến Fig. 8d là các biểu đồ thể hiện mức IFN-gama được giải phóng từ tế bào HCC1954 biểu hiện HER2 được điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Fig. 9a đến Fig. 9d là các biểu đồ thể hiện % sống sót của tế bào HCC1954 biểu hiện HER2 được điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Fig. 10 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở chuột nhắt được ghép hPBMc (tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người) mang HCC1954.

Fig. 11 là biểu đồ thể hiện lượng đếm tế bào dương tính với chất đánh dấu lympho bào ở chuột nhắt được ghép hPBMc mang HCC1954 được điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Fig. 12 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở chuột nhắt đưa gen vào (knock-in) 4-1BB mang khối u HER2/MC38 của người.

Fig. 13 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở chuột nhắt được chữa khỏi bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 và thử thách lại với tế bào khối u HER2/MC38 của người và tế bào khối u B16 F10.

Fig. 14 là biểu đồ thể hiện hiệu quả gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Fig. 15a là biểu đồ thể hiện kết quả của thử nghiệm sinh học 4-1BB phụ thuộc vào FcγRIIb đối với kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Fig. 15b là biểu đồ thể hiện kết quả của thử nghiệm sinh học 4-1BB phụ thuộc vào FcγRIIb đối với kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, ‘gồm có trình tự’, ‘về bản chất gồm có trình tự’, hoặc ‘chứa trình tự’ có thể chỉ trường hợp bất kỳ chứa trình tự, mà có thể không nhằm loại trừ trường hợp chứa thêm trình tự khác trình tự này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ ‘protein hoặc polypeptit chứa hoặc gồm có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO’ và ‘gen hoặc polynucleotit chứa hoặc gồm có trình tự axit nucleic được xác định bởi SEQ ID NO’ có thể chỉ protein (hoặc polypeptit) hoặc gen (hoặc polynucleotit), mà về bản chất gồm có trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic, hoặc mà có độ đồng nhất trình tự 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%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic mà giữ được hoạt tính và/hoặc chức năng vốn có của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” có thể bao gồm các lớp rộng của polypeptit mà có thể phân biệt được về mặt sinh hóa. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alpha, delta hoặc epsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) với một số lớp phụ giữa chúng (ví dụ, $\gamma 1$ - $\gamma 4$), và chuỗi nhẹ được phân loại là kapa hoặc lambda (K , λ). Đây là đặc tính của chuỗi này mà xác định “lớp” của kháng thể tương ứng là IgG, IgM, IgA, IgG, hoặc IgE. Các lớp phụ globulin miễn dịch (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, v.v., được xác định đặc điểm rõ ràng và đã biết là mang lại sự chuyên môn hóa chức năng.

Kháng thể nguyên vẹn bao gồm hai chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, trong đó mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với chuỗi nặng bởi liên kết disulfua. Kháng thể này có vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nặng là các loại gama (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ), hoặc epsilon (ϵ), mà còn có thể được phân loại là gama 1 ($\gamma 1$), gama 2 ($\gamma 2$), gama 3 ($\gamma 3$), gama 4 ($\gamma 4$), alpha 1 ($\alpha 1$) hoặc alpha 2 ($\alpha 2$). Vùng hằng định chuỗi nhẹ là loại kapa (κ) hoặc lambda (λ).

Thuật ngữ “chuỗi nặng” chỉ chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh của nó, bao gồm vùng biến đổi V_H mà bao gồm trình tự axit amin đủ để tạo ra tính đặc hiệu với kháng nguyên, và ba vùng hằng định, C_{H1} , C_{H2} , và C_{H3} , và vùng bản lề. Thuật ngữ “chuỗi nhẹ” chỉ chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh của nó, bao gồm vùng biến đổi V_L .

mà bao gồm trình tự axit amin đủ để tạo ra tính đặc hiệu với kháng nguyên, và vùng hằng định C_L.

Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung (CDR)” chỉ trình tự axit amin được tìm thấy ở vùng siêu biến của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Các chuỗi nặng và nhẹ có thể lần lượt bao gồm ba CDR (CDRH1, CDRH2, và CDRH3; và CDRL1, CDRL2, và CDRL3). CDR có thể cung cấp các gốc đóng vai trò quan trọng trong quá trình liên kết của kháng thể với kháng nguyên hoặc epitop. Các thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “được nhận biết đặc hiệu” được hiểu rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và chỉ ra rằng kháng thể và kháng nguyên tương tác đặc hiệu với nhau để tạo ra hoạt tính miễn dịch.

Trong bản mô tả này, kháng thể có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng; và/hoặc kháng thể của người, được làm giống của người, có nguồn gốc từ động vật (ví dụ, chuột nhắt, thỏ, v.v.), hoặc kháng thể khảm (ví dụ, kháng thể khảm chuột nhắt-người).

Kháng thể có nguồn gốc từ động vật được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật với kháng nguyên mong muốn thường có thể kích hoạt đáp ứng thải miễn dịch khi dùng cho người với mục đích điều trị, và kháng thể khảm đã được phát triển để ngăn đáp ứng thải miễn dịch này. Kháng thể khảm được tạo thành bằng cách thay thế vùng hằng định của kháng thể có nguồn gốc từ động vật, gây ra đáp ứng kháng isotyp, bằng vùng hằng định của kháng thể của người sử dụng các phương pháp thiết kế di truyền. Kháng thể khảm có đáp ứng kháng isotyp được cải thiện đáng kể so với kháng thể có nguồn gốc từ động vật, nhưng axit amin có nguồn gốc từ động vật vẫn có trong vùng biến đổi của nó và do đó nó vẫn chứa tác dụng phụ tiềm ẩn do đáp ứng kháng idiotyp. Do đó, kháng thể được làm giống của người đã được phát triển để cải thiện tác dụng phụ này. Kháng thể này được sản xuất bằng cách ghép CDR (vùng xác định bổ sung) của vùng biến đổi của kháng thể khảm, có vai trò quan trọng trong quá trình liên kết kháng nguyên vào vùng khung của kháng thể người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” chỉ mảnh có nguồn gốc từ cấu trúc globulin miễn dịch đầy đủ bao gồm phần có khả năng liên kết với kháng nguyên chẳng hạn như CDR. Ví dụ, mảnh liên kết kháng nguyên có thể là scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', hoặc F(ab')₂, nhưng không giới hạn ở đó. Theo sáng chế, mảnh liên

kết kháng nguyên có thể là mảnh có nguồn gốc từ kháng thể, bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ sung, ví dụ, được chọn từ nhóm bao gồm scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' và F(ab')₂.

Trong số các mảnh liên kết kháng nguyên, Fab là cấu trúc có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng hằng định của chuỗi nhẹ, và vùng hằng định thứ nhất (CH₁) của chuỗi nặng, và có một vị trí liên kết kháng nguyên.

Fab' khác với Fab ở chỗ nó có vùng bản lề bao gồm một hoặc nhiều gốc xystein ở đầu cùng C của miền CH₁ của chuỗi nặng. Kháng thể F(ab')₂ được tạo thành qua liên kết disulfua của gốc xystein ở vùng bản lề của Fab'.

Fv là mảnh kháng thể rất nhỏ chỉ có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và kỹ thuật tái tổ hợp để tạo ra mảnh Fv là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan. Fv hai chuỗi có thể có cấu trúc trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với vùng biến đổi chuỗi nhẹ bằng liên kết không cộng hóa trị, và Fv đơn chuỗi (scFv) thường có thể có cấu trúc dime như trong Fv hai chuỗi trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị qua thành phần liên kết peptit hoặc chúng được liên kết trực tiếp với nhau ở đầu cùng C của chúng.

Mảnh liên kết kháng nguyên có thể thu được bằng cách sử dụng proteaza (ví dụ, kháng thể đầy đủ được phân giải bằng papain để thu được mảnh Fab, và được phân giải bằng pepsin để thu được mảnh F(ab')₂), và có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp.

Globulin miễn dịch (ví dụ, globulin miễn dịch của người) hoặc phân tử kháng thể theo sáng chế có thể thuộc loại bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, IgY, v.v.), lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgA1, IgA2, v.v.), hoặc lớp phụ của phân tử globulin miễn dịch.

Trong kháng thể hoặc mảnh kháng thể, các phần (ví dụ, vùng hằng định) ngoại trừ CDR hoặc vùng biến đổi có thể có nguồn gốc từ kháng thể của người và cụ thể là, chúng có thể có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc IgY, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được tổng hợp theo cách hóa học hoặc tái tổ hợp (không xuất hiện trong tự nhiên).

Gốc nhắm đích 4-1BB

Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 có thể chứa kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích 4-1BB.

Thuật ngữ “4-1BB”, cũng được gọi là CD137 hoặc TNFRSF9 (TNF Receptor Superfamily Member 9), là thành viên của siêu họ thụ thể TNF (TNFRSF) và là phân tử đồng kích thích mà được biểu hiện theo sau quá trình hoạt hóa của tế bào miễn dịch, cả tế bào miễn dịch bẩm sinh và thích ứng. 4-1BB đóng vai trò quan trọng trong điều biến hoạt tính của nhiều tế bào miễn dịch. Như được sử dụng ở đây, 4-1BB có thể có nguồn gốc từ động vật có vú, ví dụ, Homo sapiens (người) (số truy cập NCBI NP_001552.2). Ví dụ, protein 4-1BB của người (NP_001552.2) có thể được biểu diễn bằng trình tự axit amin (SEQ ID NO: 89), như sau:

```

1      mgnscyniva tlllvlnfer trslqdpesn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr
61     tedicrqckg vftrkecss tsnaecdctp ghclgagcs mceqdckqgq eltkkgckdc
121    cftgfndqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare
181    pghspqiisf flaltstall flffltlrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg
241    cscrfpeeee ggcel

```

Theo một phương án, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa:

CDR(vùng xác định bổ sung)-H1 (H-CDR1) chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, 2 hoặc 3;

H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, 5 hoặc 6;

H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10 hoặc 11;

L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc 13;

L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc 15; và

L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc 17.

Trình tự axit amin của CDR của kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được minh họa trong Bảng 1:

Bảng 1

SEQ ID NO	H-CDR1	SEQ ID NO	H-CDR2	SEQ ID NO	H-CDR3
1	SYDMS	4	WISYSGGSIY YADSVKG	7	DGQRNSMREFD Y
				8	DAQRNSMREFD Y
				9	DAQRQSMREFD Y
2	GYDMS	5	VIYPDDGNT YYADSVKG	10	HGGQKPTTKSSS AYGMDG
3	SYWMH	6	EINPGNGHT NYNEKFKS	11	SFTTARAFAY
SEQ ID NO	L-CDR1	SEQ ID NO	L-CDR2	SEQ ID NO	L-CDR3
12	SGSSSNIGNN YVT	14	ADSHRPS	16	ATWDYSLSGYV
13	RASQTISDYL H	15	YASQSIG	17	QDGHSPPT

Ví dụ, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa:

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, L-CDR1

chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 2, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 2, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16; hoặc

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6, H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11, L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, 2 hoặc 3, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, 5 hoặc 6, và H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10 hoặc 11; và vùng

biến đổi chuỗi nhẹ chứa L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc 17.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 hoặc 88.

Trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được minh họa trong Bảng 2:

Bảng 2

SEQ ID NO	Vùng biến đổi chuỗi nặng nhắm đích 4-1BB
18	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKG LEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
19	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKG LEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
20	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKG LEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS
21	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKG LEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
22	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKG LEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
23	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS
24	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKC LEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKC LEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKC LEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS

27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKC LEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSA YGMDGWGQGTLVTVSS
28	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKC LEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSA YGMDGWGQGTLVTVSS
29	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQ CLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ nhắm đích 4-1BB
30	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATW DYSLSGYVFGGGTKLTVL
31	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATW DYSLSGYVFGGGTKLTVL
32	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPK LLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHS FPPTFGQGTKLEIKR
33	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATW DYSLSGYVFGCGTKLTVL
34	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATW DYSLSGYVFGCGTKLTVL
88	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPK LLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHS FPPTFGCGTKLEIKR

Ví dụ, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 30;

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 31;

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 32;

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 33;

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 34; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 88.

Trình tự axit amin của vùng khung của vùng biến đổi của kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được minh họa trong Bảng 3:

Bảng 3

SEQ ID NO	H-FR1	SEQ ID NO	H-FR2	SEQ ID NO	H-FR3	SEQ ID NO	H-FR4
35	EVQLLESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFS	37	WVRQA PGKGLE WVS	41	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVYY CAR	45	WGQ GTLV TVSS
35	EVQLLESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFS	37	WVRQA PGKGLE WVS	42	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDAAVYY CAK	45	WGQ GTLV TVSS
35	EVQLLESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFS	37	WVRQA PGKGLE WVS	43	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVYY CAK	45	WGQ GTLV TVSS
36	QVQLQQS GAEVIKPG ASVKLSC KASGYTFS	38	WVRQA PGQGLE WIG	44	RATLTGD TSTSTVY MELSSLRS EDTAVYY CAR	45	WGQ GTLV TVSS
35	EVQLLESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFS	39	WVRQA PGKCLE WVS	41	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVYY CAR	45	WGQ GTLV TVSS

35	EVQLLESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFS	39	WVRQA PGKCLE WVS	42	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDAAVYY CAK	45	WGQ GTLV TVSS
35	EVQLLESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFTFS	39	WVRQA PGKCLE WVS	43	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVYY CAK	45	WGQ GTLV TVSS
36	QVQLQQS GAEVIKPG ASVKLSC KASGYTFS	40	WVRQA PGQCLE WIG	44	RATLTGD TSTSTVY MELSSLRS EDTAVYY CAR	45	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	L-FR1	SEQ ID NO	L-FR2	SEQ ID NO	L-FR3	SEQ ID NO	LFR4
46	QSVLTQPP SASGTPGR RVTISC	49	WYQQI PGTAPK LLIY	51	GVPDRFSG SKSGTSAS LAISGLRS EDEADYY C	53	FGGG TKLT VL
47	QSVLTQPP SASGTPGQ RVTISC	49	WYQQI PGTAPK LLIY	51	GVPDRFSG SKSGTSAS LAISGLRS EDEADYY C	53	FGGG TKLT VL
48	DIVMTQSP AFLSVTPG EKVTITC	50	WYQQK PDQAPK LLIK	52	GIPSRFSGS GSGTDFTF TISSLEAE DAATYYC	54	FGQG TKLEI KR
46	QSVLTQPP SASGTPGR RVTISC	49	WYQQI PGTAPK LLIY	51	GVPDRFSG SKSGTSAS LAISGLRS EDEADYY C	55	FGCG TKLT VL
47	QSVLTQPP SASGTPGQ RVTISC	49	WYQQI PGTAPK LLIY	51	GVPDRFSG SKSGTSAS LAISGLRS EDEADYY C	55	FGCG TKLT VL

Theo một phương án khác, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60 hoặc 61; và chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 62, 63 hoặc 64.

Ví dụ, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa:

chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60, hoặc 61; và chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 62;

chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60 hoặc 61; và chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63; hoặc

chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60 hoặc 61; và chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 64.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là scFv (mảnh biến đổi đơn chuỗi), chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, 2 hoặc 3, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, 5 hoặc 6, và H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10 hoặc 11; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc 13, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc 15, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc 17,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với nhau theo thứ tự bất kỳ một cách trực tiếp (tức là, không có thành phần liên kết) hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Ví dụ, scFv kháng 4-1BB có thể chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 hoặc 88,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với nhau theo thứ tự bất kỳ một cách trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Ví dụ, scFv kháng 4-1BB có thể chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 33;

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, hoặc 29; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 34; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 88,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với nhau theo thứ tự bất kỳ một cách trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Theo sáng chế, scFv kháng 4-1BB chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, theo thứ tự bất kỳ. Ví dụ, scFv kháng 4-1BB có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C. Theo cách khác, scFv kháng 4-1BB có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C.

Gốc nhắm đích HER2

Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 có thể chứa kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm gốc nhắm đích HER2.

“HER2 (thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô của người 2)” được mã hóa bởi gen *ERBB2*, và là thành viên của thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR/ErbB). HER2 đã được biết đến là đóng vai trò thiết yếu trong việc điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào. Cụ thể là, khi liên kết với yếu tố tăng trưởng ngoại bào, HER2 có xu hướng mạnh là được tập hợp thành homo- và/hoặc heterodime cùng với các thụ thể HER khác, dẫn đến sự hoạt hóa một số dạng của con đường truyền tín hiệu và cảm ứng sự chết theo chu trình, sống sót, hoặc tăng sinh tế bào. Ví dụ, protein HER2 có thể là các polypeptit được nộp lưu với số truy cập trong ngân hàng gen (GenBank) NP_004439.2, NP_001005862.1, v.v. mà được mã hóa bởi các trình tự nucleotit (mARN) được nộp lưu với số truy cập GenBank NM_004448.4, NM_001005862.3, v.v., tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể kháng HER2 có thể được chọn từ nhóm bao gồm Trastuzumab, Pertuzumab, và Trastuzumab emtansine (T-DM1).

Vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng HER2 nhận biết HER2 là kháng nguyên có thể là scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' hoặc F(ab')₂ của kháng thể kháng HER2 được chọn từ nhóm bao gồm Trastuzumab, Pertuzumab, và Trastuzumab emtansine (T-DM1).

Kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa 6 CDR của Trastuzumab, Pertuzumab, hoặc Trastuzumab emtansine (T-DM1).

Theo một phương án, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là trastuzumab hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc biến thể của nó.

Ví dụ, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa:

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 65;

H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 66;

H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 67;

L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 68;

L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 69; và

L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 70.

Trình tự axit amin của CDR của kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được minh họa trong Bảng 4:

Bảng 4

SEQ ID NO	VH_CDR1	SEQ ID NO	VH_CDR2	SEQ ID NO	VH_CDR3
65	DTYIH	66	RIYPTNGYTRYADS VKG	67	WGGDGFYAM DY
SEQ ID NO	L-CDR1	SEQ ID NO	L-CDR2	SEQ ID NO	L-CDR3
68	RASQDVNTA VA	69	SASFLYS	70	QQHYTTPPT

Theo một phương án khác, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 65, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 66, và H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 67; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 68, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 69, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 70.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 71, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 72.

Trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được minh họa trong Bảng 5:

Bảng 5

SEQ ID NO	Vùng biến đổi chuỗi nặng nhắm đích HER2
71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVS
SEQ ID NO	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ nhắm đích HER2
72	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR

Theo một phương án khác, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 73 hoặc 74; và chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là scFv (mảnh biến đổi đơn chuỗi), chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 65, H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 66, và H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 67; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 68, L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 69, và L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 70,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với nhau theo thứ tự bất kỳ một cách trực tiếp (tức là, không có thành phần liên kết) hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là scFv (mảnh biến đổi đơn chuỗi), chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 71; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc về bản chất gồm có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 72,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với nhau theo thứ tự bất kỳ một cách trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Theo sáng chế, scFv kháng HER2 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, theo thứ tự bất kỳ. Ví dụ, scFv kháng HER2 có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C. Theo cách khác, scFv kháng HER2 có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C.

Kháng thể đặc hiệu kép

Sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 chứa:

(1) kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích HER2, mà có khả năng nhận biết và/hoặc liên kết đặc hiệu với protein HER2, và

(2) kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, làm gốc nhắm đích 4-1BB, mà có khả năng nhận biết và/hoặc liên kết đặc hiệu với protein 4-1BB.

Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 có thể hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu 4-1BB chỉ khi được liên kết ngang bởi tế bào khối u biểu hiện HER2.

Ngoài ra, kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chứa trong kháng thể đặc hiệu kép có thể được đặc trưng bởi sự định vị và/hoặc hoạt hóa chỉ trong vi môi trường khối u (tumor microenvironment - TME), và/hoặc làm giảm đáng kể độc tính đối với gan so với kháng thể kháng 4-1BB đã có, với sự duy trì hiệu lực tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc điều trị khối u.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa kháng thể kháng HER2 có chiều dài đầy đủ và mảnh liên kết kháng nguyên (ví dụ, scFv) của kháng thể kháng 4-1BB, trong đó mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng 4-1BB này có thể được liên kết với đầu cùng N, đầu cùng C, hoặc cả hai đầu cùng của kháng thể kháng HER2 có chiều dài đầy đủ, một cách trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa kháng thể kháng 4-1BB có chiều dài đầy đủ và mảnh liên kết kháng nguyên (ví dụ, scFv) của kháng thể kháng HER2, trong đó mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng HER2 này có thể được liên kết với đầu cùng N, đầu cùng C, hoặc cả hai đầu cùng của kháng thể kháng 4-1BB có chiều dài đầy đủ, một cách trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Theo một phương án, scFv được chứa trong kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo thứ tự bất kỳ. Ví dụ, scFv được chứa trong kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C, và tùy ý thành phần liên kết peptit giữa chúng, hoặc theo cách khác, scFv được chứa trong kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C, và tùy ý thành phần liên kết peptit giữa chúng.

Khi kháng thể đặc hiệu kép chứa kháng thể kháng HER2 có chiều dài đầy đủ và scFv kháng 4-1BB, kháng thể đặc hiệu kép này có thể chứa:

- (i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C: chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2, tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và scFv kháng 4-1BB; và
- (ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2,

trong đó scFv kháng 4-1BB có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

scFv kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và

chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2,

trong đó scFv kháng 4-1BB có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và

scFv kháng 4-1BB; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2,

trong đó scFv kháng 4-1BB có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

scFv kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và

chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2,

trong đó scFv kháng 4-1BB có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB.

Khi kháng thể đặc hiệu kép chứa kháng thể kháng 4-1BB có chiều dài đầy đủ và scFv kháng HER2, kháng thể đặc hiệu kép này có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và

scFv kháng HER2; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB,

trong đó scFv kháng HER2 có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

scFv kháng HER2,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB,

trong đó scFv kháng HER2 có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và

scFv kháng HER2; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB,

trong đó scFv kháng HER2 có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng

C:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa:

(i) polypeptit thứ nhất chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

scFv kháng HER2,

tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và

chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB; và

(ii) polypeptit thứ hai chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB,

trong đó scFv kháng HER2 có thể chứa, theo hướng từ đầu cùng N đến đầu cùng C:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2,
tùy ý, thành phần liên kết peptit (thành phần liên kết peptit thứ hai), và
vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2.

Thành phần liên kết peptit thứ nhất và thành phần liên kết peptit thứ hai có thể độc lập, có mặt hoặc không có mặt trong kháng thể đặc hiệu kép, và có thể giống nhau hoặc khác nhau.

Theo một phương án khác, cả gốc nhắm đích HER2 và gốc nhắm đích 4-1BB được chứa trong kháng thể đặc hiệu kép có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa CDR chuỗi nặng, CDR chuỗi nhẹ, hoặc tổ hợp của chúng, mà được liên kết với nhau một cách trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit.

Với việc mỗi kháng thể có thể liên kết với cả 4-1BB (chẳng hạn như, 4-1BB của người) và HER2 (chẳng hạn như, HER2 của người), các trình tự CDR, hoặc trình tự V_H (vùng biến đổi chuỗi nặng) và trình tự V_L (vùng biến đổi chuỗi nhẹ) như được bộc lộ ở đây có thể được “trộn và ghép cặp” để tạo ra các phân tử đặc hiệu kép liên kết kháng 4-1BB/kháng HER2 khác.

Thành phần liên kết peptit

Để kháng thể có độ tinh khiết cao, kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa thành phần liên kết peptit giữa chuỗi nặng và scFv trong polypeptit thứ nhất (thành phần liên kết peptit thứ nhất), và/hoặc giữa vùng biến đổi nặng và nhẹ trong scFv (thành phần liên kết peptit thứ hai).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thành phần liên kết peptit” có thể chỉ oligopeptit bao gồm từ 1 đến 100 axit amin, cụ thể là từ 2 đến 50 axit amin, mỗi chúng có thể là loại axit amin bất kỳ mà không có bất kỳ giới hạn nào. Thành phần liên kết peptit thông thường bất kỳ có thể được sử dụng có hoặc không có cải biến thích hợp theo mục đích cụ thể. Theo một phương án cụ thể, thành phần liên kết peptit có thể chứa, ví dụ, gốc Gly, Asn và/hoặc Ser, và/hoặc chứa axit amin trung tính chẳng hạn như Thr và/hoặc Ala. Trình tự axit amin thích hợp cho thành phần liên kết peptit có thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan. Chiều dài của thành phần liên kết peptit có thể được

xác định thích hợp nằm trong giới hạn mà không ảnh hưởng đến chức năng của polypeptit và/hoặc scFv. Ví dụ, thành phần liên kết peptit có thể được tạo thành bằng cách bao gồm tổng số từ khoảng 1 đến khoảng 100 axit amin, từ khoảng 2 đến khoảng 50 axit amin, hoặc từ khoảng 5 đến khoảng 25 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25) axit amin, mỗi chúng độc lập được chọn từ nhóm bao gồm Gly, Asn, Ser, Thr và Ala. Theo một phương án, thành phần liên kết peptit có thể được biểu diễn dưới dạng $(G_mS_l)_n$ (m , l , và n là số lượng của “G”, “S”, và “ (G_mS_l) ”, tương ứng), và độc lập được chọn từ số nguyên nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 10, cụ thể là, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10). Theo một phương án, thành phần liên kết peptit có thể là các axit amin (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, hoặc (GS)₉, nhưng không giới hạn ở đó.

Sử dụng trong y học

Sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép trong y học để tăng cường đáp ứng miễn dịch, và/hoặc điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Cụ thể hơn, theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép làm thành phần hoạt tính. Dược phẩm còn có thể chứa chất mang dược dụng. Dược phẩm có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch, và/hoặc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, dược phẩm này chứa kháng thể đặc hiệu kép làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng có tác dụng dược của kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm. Phương pháp còn có thể bao gồm bước nhận biết đối tượng cần điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, trước bước dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép trong bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Theo một số phương án, bệnh ung thư có thể được đặc trưng bởi sự biểu hiện của HER2 hoặc sự biểu hiện quá mức của HER2 (so với bình thường).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch, được phẩm này chứa kháng thể đặc hiệu kép làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng có tác dụng được của kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm cho đối tượng. Phương pháp còn có thể bao gồm bước nhận biết đối tượng cần tăng cường đáp ứng miễn dịch, trước bước dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép trong bào chế thuốc để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch với điều kiện là có mặt HER2. Ví dụ, trong phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch, đối tượng có thể có tế bào biểu hiện HER2 hoặc biểu hiện quá mức HER2 (ví dụ, tế bào ung thư biểu hiện HER2 hoặc biểu hiện quá mức HER2).

Bệnh ung thư cần được ngăn ngừa và/hoặc điều trị bởi kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm có thể liên quan đến 4-1BB và/hoặc HER2, cụ thể là, bệnh ung thư biểu hiện HER2 hoặc biểu hiện quá mức HER2. Bệnh ung thư có thể được chọn từ bệnh ung thư rắn và bệnh ung thư máu. Bệnh ung thư có thể là, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư phổi (ví dụ, caxinom tế bào vảy của phổi, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, ung thư tuyến của phổi), caxinom phúc mạc, bệnh ung thư da, caxinom tế bào vảy, u hắc sắc tố ở da hoặc nhàn cầu, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư gần hậu môn, bệnh ung thư thực quản, bệnh u ruột non, bệnh ung thư tuyến nội tiết, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacom mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh bạch cầu mạn tính hoặc cấp tính, u lympho bạch huyết, bệnh u gan, bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư tụy, bệnh u nguyên bào xốp, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, u tuyến tế bào gan, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom màng

trong tử cung hoặc caxinom tử cung, u tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, bệnh ung thư ống mật, bệnh ung thư túi mật và các bệnh tương tự. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư nguyên phát hoặc bệnh ung thư di căn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư” có thể chỉ sự chết tế bào ung thư, ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư, giảm nhẹ triệu chứng liên quan đến ung thư, ức chế sự di căn ung thư, v.v..

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường đáp ứng miễn dịch” có thể chỉ sự hoạt hóa tín hiệu 4-1BB, tăng cường đáp ứng miễn dịch bất kỳ liên quan đến 4-1BB, chẳng hạn như hoạt hóa tín hiệu cảm ứng bởi 4-1BB (ví dụ, hoạt hóa tín hiệu NF-kB cảm ứng bởi 4-1BB, làm tăng sự giải phóng xytokin, tiêu diệt tế bào đích bởi tế bào miễn dịch, chẳng hạn như tế bào T, và tương tự, nhưng không giới hạn ở đó). Theo một số phương án, sự tăng cường đáp ứng miễn dịch bởi kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất theo sáng chế có thể xảy ra khi có mặt HER2.

Dược phẩm còn có thể chứa chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng, ngoài kháng thể đặc hiệu kép làm thành phần hoạt tính. Chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng có thể là chất bất kỳ được chọn từ các chất thường được sử dụng cho dạng bào chế của kháng thể. Ví dụ, chất mang được dụng có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, gôm acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, xenluloza, nước, xirô, metyl xenluloza, metylhydroxy benzoat, propylhydroxy benzoat, talc, magie stearat, và dầu khoáng, nhưng không giới hạn ở đó.

Dược phẩm còn có thể chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất làm trơn, chất làm ướt, chất tạo ngọt, chất tăng cường hương vị, chất nhũ hóa, chất tạo hỗn dịch, chất bảo quản và chất tương tự.

Kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm có thể được dùng cho đối tượng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa có thể là tiêm trong tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, dùng qua nội mô, dùng tại chỗ, dùng trong mũi, dùng trong phổi hoặc dùng qua trực tràng. Bởi vì việc dùng qua đường miệng dẫn đến sự tiêu hóa protein hoặc peptit, nên thành phần hoạt tính

trong chế phẩm dùng qua đường miệng phải được phủ hoặc bào chế để ngăn sự tiêu hóa ở dạ dày. Ngoài ra, chế phẩm có thể được dùng bằng cách sử dụng thiết bị tùy ý cho phép phân phối thành phần hoạt tính đến tế bào đích (ví dụ, tế bào ung thư).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng có tác dụng được” có thể chỉ lượng mà ở đó thành phần hoạt tính, kháng thể đặc hiệu kép, có thể tạo ra hiệu quả có ý nghĩa về mặt dược lý trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư. Lượng có tác dụng được của kháng thể đặc hiệu kép, hoặc liều lượng thích hợp của dược phẩm được xác định bởi lượng kháng thể đặc hiệu kép, có thể được kê đơn theo nhiều cách khác nhau, phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như tuổi, trọng lượng cơ thể, giới tính, tình trạng bệnh lý, chế độ ăn, tốc độ bài tiết, và/hoặc độ nhạy phản ứng của bệnh nhân, dạng bào chế, thời gian dùng, đường dùng, cách dùng và các yếu tố tương tự. Ví dụ, lượng có tác dụng được của kháng thể đặc hiệu kép, hoặc liều lượng thích hợp của dược phẩm, có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến khoảng 1000 mg (lượng kháng thể đặc hiệu kép)/kg (trọng lượng cơ thể), từ khoảng 0,01 đến khoảng 100 mg/kg, hoặc từ 0,1 đến 50 mg/kg mỗi ngày cho cá thể trưởng thành.

Đối tượng dùng kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm có thể là đối tượng được chọn từ động vật có vú, ví dụ, người, khỉ, chuột cống, chuột nhắt, chó, mèo, chuột lang, thỏ, chuột cống, chuột nhắt, ngựa, gia súc, bò, và động vật tương tự, hoặc tế bào hoặc mô thu được từ chúng, nhưng không giới hạn ở đó, và có thể là đối tượng mắc bệnh ung thư.

Dược phẩm có thể được bào chế với chất mang và/hoặc tá dược được dùng thành dạng liều đơn vị hoặc dạng nhiều liều bằng phương pháp dễ dàng được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan. Dạng liều có thể là dung dịch trong dầu hoặc môi trường trong nước, hỗn dịch, xirô, dung dịch nhũ hóa, chiết phẩm, bột, hạt, viên nén, hoặc viên nang, và còn có thể bao gồm chất phân tán hoặc chất làm ổn định.

Polynucleotit, vector tái tổ hợp và điều chế kháng thể

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ, polypeptit có thể chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2 như được mô tả ở đây và scFv của kháng thể kháng 4-1BB như được mô tả ở đây, mà được liên kết trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit; và

polynucleotit thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2. Theo cách khác, polypeptit có thể chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng 4-1BB như được mô tả ở đây và scFv của kháng thể kháng HER2 như được mô tả ở đây, mà được liên kết trực tiếp hoặc qua thành phần liên kết peptit; và polynucleotit thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng 4-1BB.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit. Ví dụ, vector tái tổ hợp có thể chứa polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai cùng trong một vector hoặc tách riêng trong hai vector. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào tái tổ hợp chứa polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai. Ví dụ, tế bào tái tổ hợp có thể là tế bào được chuyển nhiễm với vector tái tổ hợp.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể đặc hiệu kép, bao gồm bước biểu hiện polynucleotit, ví dụ polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai, ở tế bào. Bước biểu hiện polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy tế bào chứa polynucleotit (ví dụ, trong vector tái tổ hợp) trong điều kiện cho phép sự biểu hiện của polynucleotit. Phương pháp còn có thể bao gồm bước tách và/hoặc tinh chế kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ quá trình nuôi cấy tế bào, sau bước biểu hiện hoặc nuôi cấy.

Thuật ngữ “vector” chỉ phương tiện biểu hiện gen đích ở tế bào chủ, ví dụ như vector plasmit, vector cosmit, và vector virus chẳng hạn như vector thể thực khuẩn, vector adenovirus, vector retrovirus và vector virus liên quan đến adeno. Vector tái tổ hợp có thể được tạo cấu trúc từ plasmit thường xuyên được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, nhóm pGEX, nhóm pET, và pUC19), thể thực khuẩn (ví dụ, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1 và M13) hoặc bằng cách thao tác virus (ví dụ, SV40, v.v.).

Trong vector tái tổ hợp, polynucleotit có thể được liên kết theo cách hoạt động được với vùng khởi động. Thuật ngữ “được liên kết theo cách hoạt động được” nhằm nói đến liên kết chức năng giữa trình tự nucleotit đang quan tâm và trình tự điều hòa biểu hiện (ví dụ, trình tự vùng khởi động). Khi “được liên kết theo cách hoạt động được”, yếu tố điều hòa có thể kiểm soát quá trình phiên mã và/hoặc dịch mã của nucleotit đang quan tâm.

Vectơ tái tổ hợp thường có thể được tạo cấu trúc dưới dạng vectơ tách dòng hoặc vectơ biểu hiện. Đối với vectơ biểu hiện tái tổ hợp, có thể sử dụng vectơ nói chung có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan để biểu hiện protein ngoại lai ở tế bào thực vật, động vật hoặc tế bào vi khuẩn. Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng để tạo cấu trúc vectơ tái tổ hợp.

Để sử dụng ở vật chủ, chẳng hạn như tế bào nhân sơ hoặc nhân thực, vectơ tái tổ hợp có thể được tạo cấu trúc cho phù hợp. Ví dụ, khi vectơ được tạo cấu trúc dưới dạng vectơ biểu hiện để sử dụng trong vật chủ nhân sơ, vectơ này thường bao gồm vùng khởi động mạnh cho phiên mã (ví dụ, vùng khởi động pL κ , vùng khởi động CMV, vùng khởi động *trp*, vùng khởi động *lac*, vùng khởi động *tac*, vùng khởi động T7, v.v.), vị trí liên kết ribosom để bắt đầu dịch mã, và trình tự kết thúc phiên mã/dịch mã. Mặt khác, vectơ biểu hiện để sử dụng trong vật chủ nhân thực bao gồm điểm khởi đầu sao chép điều khiển được ở tế bào nhân thực, chẳng hạn như điểm khởi đầu sao chép f1, điểm khởi đầu sao chép SV40, điểm khởi đầu sao chép pMB1, điểm khởi đầu sao chép adeno, điểm khởi đầu sao chép AAV, và điểm khởi đầu sao chép BBV, nhưng không giới hạn ở đó. Ngoài ra, vectơ biểu hiện thường bao gồm vùng khởi động có nguồn gốc từ hệ gen của tế bào động vật có vú (ví dụ, vùng khởi động metallothionein) hoặc virus của động vật có vú (ví dụ, vùng khởi động muợn adenovirus, vùng khởi động 7.5K virus vaccinia, vùng khởi động SV40, vùng khởi động cytomegalovirus, và vùng khởi động *tk* của HSV), và trình tự bổ sung chuỗi poly (A) là trình tự kết thúc phiên mã.

Tế bào tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng cách đưa vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ thích hợp. Miễn là nó cho phép tách dòng tuần tự và biểu hiện vectơ tái tổ hợp theo cách ổn định, tế bào chủ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ về tế bào chủ nhân sơ dùng được cho sáng chế có thể được chọn từ *E. coli*, *Bacillus* spp. chẳng hạn như *Bacillus subtilis* và *Bacillus thuringiensis*, và các chủng enterobacteriaceae chẳng hạn như *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* và nhiều loài *Pseudomonas* khác nhau. Các tế bào chủ nhân thực có thể được sử dụng để biến nạp có thể được chọn từ, nhưng không giới hạn ở, *Saccharomyce cerevisiae*, tế bào côn trùng, và tế bào động vật, chẳng hạn như Sp2/0, CHO (buồng trứng chuột đồng Trung Quốc - Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN và MDCK.

Polynucleotit hoặc vector tái tổ hợp mang polynucleotit này có thể được đưa (được chuyển nhiễm) vào tế bào chủ sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan. Ví dụ, quá trình chuyển nhiễm này có thể được thực hiện sử dụng phương pháp CaCl_2 hoặc xung điện khi tế bào chủ là tế bào nhân sơ. Đối với tế bào chủ nhân thực, việc đưa vào di truyền có thể đạt được bằng cách sử dụng, nhưng không giới hạn ở, tiêm vào tế bào, kết tủa canxi phosphat, xung điện, chuyển nhiễm được trung gian bởi liposom hoặc bắn phá hạt.

Để lựa chọn tế bào chủ được biến nạp, có thể sử dụng lợi thế của kiểu hình liên quan đến gen đánh dấu lựa chọn theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, khi gen đánh dấu lựa chọn là gen được cho là kháng một kháng sinh nhất định, tế bào chủ có thể sinh trưởng khi có mặt kháng sinh này trong môi trường để chọn thể biến nạp đang quan tâm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép, phương pháp này bao gồm bước biểu hiện polynucleotit hoặc vector tái tổ hợp ở tế bào chủ. Theo một phương án, phương pháp sản xuất có thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào tái tổ hợp chứa polynucleotit hoặc vector tái tổ hợp trong tế bào này, và tùy ý phân lập và/hoặc tinh chế kháng thể từ môi trường nuôi cấy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ.

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa sáng chế và không được hiểu là làm giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1. Kháng thể kháng 4-1BB

1.1 Điều chế kháng thể đơn dòng của người đầy đủ kháng 4-1BB

Kháng thể đơn dòng của người đầy đủ kháng 4-1BB ở dạng IgG có chiều dài đầy đủ được sàng lọc bằng cách chọn lọc ống miễn dịch thư viện thể thực khuẩn kháng 4-1BB. Để chọn lọc thư viện thể thực khuẩn (thu được từ KBio Health và CUREBIO) kháng các phân tử đích, tổng số bốn vòng chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng ống miễn dịch được phủ 4-1BB (số truy cập NCBI NP_001552.2).

Khuẩn lạc vi khuẩn từ 3 vòng kết quả đầu ra chọn lọc được sinh trưởng trong SB-Carbenicillin (Biomatik cat# A2311-5g) trong đĩa 96 giếng sâu đến khi đục, ở đó điểm

10^{11} pfu của thể thực khuẩn VCSM13 (K-Bio Health) được bổ sung vào mỗi giếng. Sau 1 giờ chuyển nhiễm ở 37°C bằng cách lắc nhẹ (80 vòng/phút), kanamycin $70\text{ }\mu\text{g/mL}$ được bổ sung và tế bào được nuôi cấy qua đêm ở 30°C bằng cách lắc ở điều kiện 200 vòng/phút.

Ngày tiếp theo, đĩa được quay ly tâm và dịch nổi chứa thể thực khuẩn được bổ sung vào đĩa ELISA được phủ kháng nguyên 4-1BB được phong bế bằng 3% (thể tích/thể tích) BSA (albumin huyết thanh bò) trong PBST (nước muối đệm phosphat với Tween 20). Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ phòng, đĩa được rửa ba lần bằng PBST và kháng thể kháng M13 (Sino Biological cat#11973-MM05) được bổ sung. Đĩa được ủ trong 1 giờ, được rửa ba lần bằng PBST, và hoạt tính liên kết được đo bằng cách sử dụng tetramethylbenzidin (TMB).

Chất gắn kết đặc hiệu 4-1BB được khuếch đại để giải trình tự ADN plasmid. Các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (VL và VH) được phân tích để nhận biết trình tự độc nhất và xác định độ đa dạng trình tự, như được thể hiện trong Bảng 6 đến Bảng 13 (gạch chân: theo thứ tự CDR1, CDR2 và CDR3). Kháng thể kháng 4-1BB được ký hiệu là BMUR (Urelumab của BMS, patent Mỹ số 7,288,638) được sử dụng để so sánh hoạt tính chủ vận trong các ví dụ dưới đây.

Bảng 6

1A10	Trình tự axit amin ($\text{N}' \rightarrow \text{C}'$)
Chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGK GLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTY TCNVDHKPSNTKVKDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 56)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGK GLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGT LVT SS (SEQ ID NO: 18)

H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DGQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 7)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 7

1A10 M4	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	EVQLLES ^{GGGLVQPGGSLRL} SCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN ^{SKNTLYL} QMNSLRAEDTAVYYCARD ^{AQRNSMREFDY} WGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG ^{TKTY} TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ^{TPPVLDSDG} SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 57)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES ^{GGGLVQPGGSLRL} SCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN ^{SKNTLYL} QMNSLRAEDTAVYYCARD ^{AQRNSMREFDY} WGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 19)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 8)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED

	EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 8

1A10 M11	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD AQRQSMREFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 58)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD AQRQSMREFDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 20)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 9)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)

L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 9

1A10 M12	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL <u>SCAASGFTFSSYDMS</u> WVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>AQRNSMREFDY</u> WGQGT LVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLG TKTY TCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 57)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL <u>SCAASGFTFSSYDMS</u> WVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>AQRNSMREFDY</u> WGQGT LVTV SS (SEQ ID NO: 19)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 8)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS RSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 63)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 10

1A10 M13	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DAQRQSMREFDY</u> WGQGT LVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TKTY TCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK (SEQ ID NO: 58)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DAQRQSMREFDY</u> WGQGT LVTV SS (SEQ ID NO: 20)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 9)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 63)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 11

1A12	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQ APGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSA YGMDGW GQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD

	YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLGK (SEQ ID NO: 59)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQ APGKGLEWVS <u>VIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTL YLQMNSLRAEDAAVYYCAK <u>HGGQKPTTKSSSA</u> YGMDGW GQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 21)
H-CDR1	GYDMS (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSA YGMDG (SEQ ID NO: 10)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYYVTWYQQLP GTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED</u> EADYYC <u>ATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF</u> PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 62)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYYVTWYQQLP GTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED</u> EADYYC <u>ATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 12

1A12 M1	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQ APGKGLEWVS <u>VIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>HGGQKPTTKSSSA</u> YGMDGW GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

	TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 60)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQ APGKGLEWVS <u>VIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22)
H-CDR1	GYDMS (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (SEQ ID NO: 10)
Chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 63)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

Bảng 13

AB41	Trình tự axit amin (N'→C')
Chuỗi nặng	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQ APGQGLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTV YMELSSLRSED TAVYYCAR <u>SFTTARAFA</u> YWGQGT LTVVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYT CNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK (SEQ ID NO: 61)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQ APGQGLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTV YMELSSLRSED TAVYYCAR <u>SFTTARAFA</u> YWGQGT LTVVSS (SEQ ID NO: 23)

H-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 3)
H-CDR2	EINPGNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 6)
H-CDR3	SFTTARAFAY (SEQ ID NO: 11)
Chuỗi nhẹ	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPD QAPKLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQDGHSFPPTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPD QAPKLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQDGHSFPPTFGQGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 32)
L-CDR1	RASQTISDYHL (SEQ ID NO: 13)
L-CDR2	YASQSIG (SEQ ID NO: 15)
L-CDR3	QDGHSFPPT (SEQ ID NO: 17)

1.2. Điều chế kháng thể scFv kháng 4-1BB

Kháng thể scFv kháng 4-1BB có cấu trúc là (N')-VL-thành phần liên kết-VH-(C') được điều chế bằng cách sử dụng vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng của người đầy đủ kháng 4-1BB thể hiện trong Bảng 6 đến Bảng 13 của ví dụ 1.1, trong đó gốc axit amin "G" ở vị trí 44 của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng "C", và gốc axit amin "G" ở vị trí 103 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng "C". Thay thế axit amin từ "G" thành "C" như vậy trong scFv có thể góp phần làm tăng độ ổn định của kháng thể đặc hiệu kép chứa scFv làm một gốc đặc hiệu với đích. Trình tự axit amin của scFv kháng 4-1BB đã điều chế được minh họa trong Bảng 14 đến Bảng 19 dưới đây, trong khi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể áp dụng các thay đổi hoặc cải biến trình tự axit amin theo các phương án dưới đây để đáp ứng mục đích cụ thể, bao gồm việc áp dụng các loại thành phần liên kết peptit khác nhau chẳng hạn như (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (GGGGS)₄ hoặc (GS)₉.

Bảng 14

1A10 (scFv)	Trình tự axit amin (N'→C')
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
Thành phần liên kết	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)

Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGT LV TVSS (SEQ ID NO: 24)
-------------------------------	--

Bảng 15

1A10 M4 (scFv)	Trình tự axit amin (N'→C')
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:87)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQGT LV TVSS (SEQ ID NO: 25)

Bảng 16

1A10 M12 (scFv)	Trình tự axit amin (N'→C')
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQGT LV TVSS (SEQ ID NO: 25)

Bảng 17

1A12 (scFv)	Trình tự axit amin (N'→C')
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQ APGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGW GQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 27)

Bảng 18

1A12 M1 (scFv)	Trình tự axit amin (N'→C')
----------------	----------------------------

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGNNYVTWYQQLP GTAPKLLIYADSHRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
Thành phần liên kết	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQ APGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRSEDVAVYYCAKHGGQKPTTKSSAYGMDGW GQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 28)

Bảng 19

AB41 (scFv)	Trình tự axit amin (N'→C')
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPD QAPKLLIKYASQSIGPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQDGHSFPPTFGCGTKLEIKR (SEQ ID NO: 88)
Thành phần liên kết	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVR QAPGQCLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTST VYMELSSLRSEDVAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 29)

1.3. Khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng 4-1BB (dạng IgG có chiều dài đầy đủ) với 4-1BB của người

(1) Hoạt tính liên kết kháng nguyên được đo bằng phương pháp ELISA

Để đánh giá hoạt tính liên kết kháng nguyên, các ứng viên kháng thể được điều chế trong ví dụ 1.1 được thực hiện thử nghiệm ELISA. Nói ngắn gọn, vi đĩa được phủ protein 4-1BB-Fc của người (Sino Biological) ở nồng độ 0,1 µg/mL trong PBS, 100 µl/giếng ở 4°C qua đêm, và sau đó được phong bế bằng 100 µl/giếng 5% (thể tích/thể tích) BSA. Các dung dịch pha loãng năm lần của kháng thể được làm giống của người (1A10, 1A12 và AB41) bắt đầu từ 10 µg/mL được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 1-2 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Đĩa được rửa bằng PBS/Tween và sau đó ủ với kháng thể của dê kháng IgG của người được liên hợp với Peroxidaza cải ngựa (Horse Radish Peroxidase - HRP) (Thermo) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, đĩa được hiện ảnh bằng cơ chất TMB và phân tích bằng máy quang phổ ở mật độ quang học 450-630nm.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 1a. Như được thể hiện trên Fig. 1a, tất cả các kháng thể kháng 4-1BB được thử nghiệm đều thể hiện khả năng liên kết 4-1BB.

(2) Hoạt tính liên kết tế bào được đo bằng phương pháp FACS

Để đánh giá hoạt tính liên kết tế bào, các ứng viên kháng thể được phân tích khả năng liên kết của nó với 4-1BB được biểu hiện ở tế bào động vật có vú bằng phương pháp phân loại tế bào hoạt hóa bởi huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting - FACS). Nói ngắn gọn, dòng tế bào GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega; 3×10^5 tế bào), là tế bào Jurkat biểu hiện 4-1BB trên bề mặt của chúng, được ủ với kháng thể (1A10 và 1A12; mỗi loại 10ug/mL). Sau khi rửa bằng đệm FACS (1%(thể tích/thể tích) BSA trong PBS), kháng thể FITC-kháng IgG của người (Sigma, F9512, nồng độ: 2,0mg/mL) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở 4°C trong 1 giờ. Cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity - MFI) của FITC được đánh giá bằng thiết bị FACSCalibur (BD Biosciences).

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 1b. Như được thể hiện trên Fig. 1b, tất cả các kháng thể kháng 4-1BB được thử nghiệm đều thể hiện khả năng liên kết với 4-1BB mà được biểu hiện trên bề mặt tế bào và có thể liên kết hiệu quả với 4-1BB được biểu hiện ở tế bào động vật có vú.

Ví dụ 2. Điều chế kháng thể kháng HER2

Trastuzumab (Genentech; từ đây được đề cập đến là “HER2(WT)”, số truy cập DrugBank DB00072; kháng thể đơn dòng IgG1 kapa của người), hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chẳng hạn như scFv có thể được sử dụng làm gốc nhắm đích HER2 cho kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2.

Trình tự của HER2(WT) được tóm tắt trong Bảng 20 dưới đây.

Vùng hằng định của kháng thể kháng HER2 được chứa trong kháng thể đặc hiệu kép có thể được cải biến bằng cách đưa nhiều hơn một đột biến hoặc thay đổi vào IgG1 của người, một phương án làm ví dụ, HER2(NA hoặc N297A) được thể hiện trong Bảng 20 dưới đây:

Bảng 20

HER2(WT)	Trình tự
Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF

	LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 73)
Chuỗi nhẹ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 75)
HER2(NA) (N297A)	Trình tự
Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 74)
Chuỗi nhẹ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 75)

Ví dụ 3. Điều chế kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2

Các ứng viên kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được điều chế ở định dạng IgG có chiều dài đầy đủ (kháng thể kháng HER2)-scFv(kháng thể kháng 4-1BB) hoặc ở định dạng IgG có chiều dài đầy đủ (kháng thể kháng 4-1BB)-scFv(kháng thể kháng HER2): Trong ví dụ này, dòng IgG kháng HER2 và scFv 4-1BB được điều chế trong ví dụ 2 và ví dụ 1.2, tương ứng, được chọn làm ví dụ, để điều chế kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 ở dạng dung hợp IgG-scFv (mảnh kháng thể scFv của một kháng nguyên được dung hợp với đầu cùng C của IgG của kháng nguyên khác). Khi HER2 được đặt trong phần IgG đầy đủ, IgG1 với mạch chính đột biến giảm

ADCC (N297A mutation; Cancer Cell, vol.19, issue 1, pp.101-113, etc.) được sử dụng, và khi 4-1BB được đặt trong phần IgG đầy đủ, IgG4 được sử dụng.

Đoạn ADN 1 có trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể IgG của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được chèn vào pcADN 3.4 (Invitrogen, A14697; plasmit 1), và đoạn ADN 2 có trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể IgG của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được chèn vào pcADN 3.4 (Invitrogen, A14697; plasmit 2). Sau đó, đoạn ADN 3 mã hóa scFv được dung hợp ở một phần của đoạn ADN 1 tương ứng với đầu cùng C của vùng Fc của kháng thể IgG được chèn vào plasmit 1, sử dụng đoạn ADN 4 mã hóa thành phần liên kết peptit có chiều dài 15 axit amin gồm (GGGGS)₃ hoặc sử dụng đoạn ADN 5 mã hóa thành phần liên kết peptit có chiều dài 18 axit amin gồm (GS)₉, để tạo cấu trúc các vector để biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép. Ngoài ra, để làm ổn định scFv, như được mô tả trong ví dụ 1.2, cải biến bổ sung được áp dụng để tạo ra cầu disulfua dung hợp VL103-VH44 (VL103: VL có đột biến G→C ở vị trí 103; VH 44: VH có đột biến G→C ở vị trí 44) vào đầu cùng C của chuỗi nhẹ và đầu cùng C của chuỗi nặng, tương ứng.

Trong số các kháng thể đặc hiệu kép được điều chế, trình tự của chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, scFv và đoạn ADN được sử dụng trong điều chế một số kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ được minh họa trong Bảng 21 đến Bảng 29. Một hoặc nhiều hơn một đột biến điểm trong trình tự axit amin có thể áp dụng trong kháng thể được thể hiện dưới đây, nhằm mục đích cải thiện độ ổn định và hiệu lực, làm giảm tính sinh miễn dịch và v.v..

Bảng 21

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA) _x 1A10 1		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY

		SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 85)
③ scFv của kháng thể kháng 4-1BB	VL	<u>QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNY</u> <u>VTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSG</u> <u>SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL</u> <u>GYVFGCGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 33)
	Thành phần liên kết	GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	<u>EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY</u> <u>DMSWVRQAPGKC LEWVSWISYSGGSIYYADS</u> <u>VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY</u> <u>YCARDGQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS</u> (SEQ ID NO: 24)
	Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ PPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFG CGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKC LEWVSWISYSGGSIYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDGQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 76)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYYTPPT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 22

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA) _{x1A10 2}		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ scFv của kháng thể kháng 4-1BB	VL QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
	Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT

		QKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVL TQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTW YQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGY VFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDGQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 77)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 23

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA) _{x1A10} M4		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ scFv của kháng thể kháng 4-1BB	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNY VTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS LSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
	Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY DMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYAD

		SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDQAQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 25)
	Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSG SQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNN YVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQAPGKC LEWVSWISYSGGS IYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 78)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHQHYTTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 24

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA) _{x1A10 M12}		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY

		VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ scFv của kháng thể kháng 4- 1BB	VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNY <u>VTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS</u> <u>GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS</u> <u>LSGYVFGCGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 34)
	Thành phần liên kết	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY DMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGSIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDQAQRNSMREFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 25)
	Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSG SQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNN YVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGS GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGS IYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQGTLLT VSS (SEQ ID NO: 79)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGHYTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT

		ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)
--	--	---

Bảng 25

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA) _{x1A12} 1		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 85)
	③ scFv của kháng thể	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
	kháng 4-1BB	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 27)
Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

		KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNY <u>VTWYQQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS</u> GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS <u>LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS</u> GGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDG <u>NTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR</u> AEDA AVYYCAKHGGGQKPTTKSSSA YGMDG WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 80)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 26

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA)x1A12 2		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ scFv của kháng	VL QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNY <u>VTWYQQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS</u> GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS <u>LSGYVFGCGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 33)

	thể kháng 4- 1BB	Thành phần liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGY DMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 27)
	Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSG SQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNN YVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDG NTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDG WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 81)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHQHYTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 27

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (NA) _{x1A12} M1		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS

		TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	② Thành phần liên kết	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ scFv của kháng thể kháng 4-1BB	VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNY <u>VTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS</u> <u>GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS</u> <u>LSGYVFGCGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 34)
	Thành phần liên kết	VH GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	Thành phần chuỗi nặng ((1)+(2)+(3))	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGY DMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 28)
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG SQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNN <u>YVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRF</u> <u>SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS</u> <u>LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGS</u> GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDG NTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR

		AEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDG WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 82)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 28

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (WT) _{x1A10 M12}		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVT VSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
	② Thành phần liên kết	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ scFv của kháng thể kháng 4-1BB	VL
		QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNY VTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS LSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
		Thành phần liên kết
		VH
		GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY DMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD AQRNSMREFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 25)
	Thành phần chuỗi nặng ((①+②+③))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVT VSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

		EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSGS SQSVLTQPPSASGTPGQRTVISC<u>SGSSSNIGNN</u> <u>YVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRF</u> SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS <u>LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS</u> GGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGS <u>IYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE</u> DTAVYYCARD<u>AQRNSMREFDYWGQGLVT</u> VSS (SEQ ID NO: 83)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Bảng 29

Kháng thể đặc hiệu kép HER2 (WT) _{x1A12 M1}		Trình tự axit amin (N'→C')
Thành phần chuỗi nặng	① Chuỗi nặng của kháng thể kháng HER2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
	② Thành phần liên kết	SGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)

	③ scFv của kháng thể kháng 4-1BB	VL	<u>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNY</u> <u>VTWYQQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFS</u> <u>GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS</u> <u>LSGYVFGCGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 34)
		Thành phần liên kết	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
		VH	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGY</u> <u>DMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYAD</u> <u>SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTL</u> <u>VTVSS</u> (SEQ ID NO: 28)
	Thành phần chuỗi nặng (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSG SQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNN <u>YVTWYQQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRF</u> <u>SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYS</u> <u>LSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGS</u> <u>GGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG</u> <u>FTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDG</u> <u>NTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDG</u> <u>WGQGT LVTVSS</u> (SEQ ID NO: 84)
Thành phần chuỗi nhẹ	Chuỗi nhẹ của kháng thể kháng HER2		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYYTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

Ví dụ 4. Thử nghiệm ái lực liên kết của kháng thể đặc hiệu kép (Bispecific Antibody - BsAb)

4.1. Liên kết với HER2 của người

Ái lực liên kết HER2 của kháng thể đặc hiệu kép được thực hiện bằng phương pháp ELISA tham khảo đến ví dụ 1.3(1). Nói ngắn gọn, vi đĩa 96 giếng (Nunc-Immuno Plates, NUNC) được phủ protein HER2-His của người (Sino Biological, 10004-H08H) ở nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ trong PBS, 100 μl /giếng ở 4°C qua đêm, và sau đó được phong bế bằng đệm phong bế (200 μl /giếng 1%(thể tích/thể tích) BSA (albumin huyết thanh bò (Gibco, 30063572)) trong PBS) trong 2 giờ ở 37°C. Các dung dịch pha loãng theo dãy (bắt đầu từ 0,1 μM) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được điều chế trong ví dụ 3 và kháng thể kháng HER2 (HER2(NA)) làm đối chứng được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở 37°C. Đĩa được rửa bằng PBS/0,05% Tween20 và ủ với kháng thể Fab được liên hợp với HRP (Pierce, 31414) trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi rửa, đĩa được hiện ảnh bằng cơ chất TMB (Tetrametylbendizin, Sigma, T0440) và được phân tích bằng máy quang phổ ở OD 450-650nm.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 2a và Fig. 2b. Như được thể hiện trên Fig. 2a và Fig. 2b, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm có thể liên kết với protein HER2 của người với ái lực cao, tương tự với ái lực của kháng thể kháng HER2 đối chứng (NA).

4.2. Liên kết với 4-1BB của người

Ái lực liên kết 4-1BB của kháng thể đặc hiệu kép được thực hiện bằng phương pháp ELISA tham khảo đến ví dụ 1.3(1). Nói ngắn gọn, vi đĩa 96 giếng (Nunc-Immuno Plates, NUNC) được phủ protein 4-1BB-His của người (Sino Biological, 10041-H08H) ở nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ trong PBS, 100 μl /giếng ở 4°C qua đêm, và sau đó được phong bế bằng đệm phong bế (200 μl /giếng 1%(thể tích/thể tích) BSA (albumin huyết thanh bò (Gibco, 30063572)) trong PBS) trong 2 giờ ở 37°C. Các dung dịch pha loãng theo dãy (bắt đầu từ 0,1 μM) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được điều chế trong ví dụ 3 và kháng thể kháng HER2 (HER2(NA)) làm đối chứng được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở 37°C. Đĩa được rửa bằng PBS/0,05% Tween20 và ủ với kháng thể Fab được liên hợp với HRP (Pierce, 31414) trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi

rửa, đĩa được hiện ảnh bằng cơ chất TMB và phân tích bằng máy quang phổ ở OD 450-650nm.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 3a và Fig. 3b. Như được thể hiện trên Fig. 3a và Fig. 3b, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm có thể liên kết với protein 4-1BB của người với ái lực cao, trong khi đó kháng thể kháng HER2 không liên kết với protein 4-1BB của người.

Các kết quả của Fig. 2a, Fig. 2b, Fig. 3a, và Fig. 3b được định lượng và tóm tắt trong Bảng 30 dưới đây:

Bảng 30

EC50 (nM)	HER2	4-1BB
HER2(NA)	0,134	N/A
HER2(WT)x1A10 M12	0,159	0,027
HER2(NA)x1A10	0,135	0,033
HER2(NA)x1A10 M4	0,148	0,025
HER2(NA)x1A10 M12	0,161	0,031
HER2(WT)x1A12 M1	0,174	0,051
HER2(NA)x1A12	0,148	0,043
HER2(NA)x1A12 M1	0,143	0,048

Như được thể hiện trong Bảng 30, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm có thể liên kết với cả protein HER2 của người và 4-1BB của người với ái lực cao.

4.3. Liên kết với HER2 của người được biểu hiện trên bề mặt tế bào

Ái lực liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với các tế bào biểu hiện HER2 trên bề mặt của chúng được thực hiện bằng phân tích FACS tham khảo đến ví dụ 1.3(2).

Các dòng tế bào khối u như liệt kê trong Bảng 31 được sử dụng. Sau khi phân tách mỗi dòng tế bào và rửa trong PBS, số lượng tế bào được đếm và thiết lập là 2×10^5 tế bào/100 μ l đệm FACS, và sau đó kháng thể kháng HER2 hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được xử lý ở nồng độ 10 μ g/mL, và chúng được phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau phản ứng, tế bào được rửa trong đệm FACS, và sau đó kháng thể đặc hiệu vùng hằng định (Fc) đánh dấu FITC (thể liên hợp của dê kháng IgG của người

FITC, đặc hiệu Fc, Sigma, F9512, nồng độ: 2,0mg/mL) được tạo huyền phù trong $2\mu\text{l}/2 \times 10^5$ tế bào/100 μl đệm FACS, và được phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau phản ứng, tế bào được rửa trong đệm FACS, phân tích bằng cách sử dụng thiết bị FACSCalibur. Nhóm đối chứng âm chỉ được xử lý với kháng thể đặc hiệu vùng hằng định (Fc) đánh dấu FITC. Để so sánh mức biểu hiện của HER2 giữa các dòng tế bào ung thư này, giá trị của kết quả về sự dịch chuyển đỉnh trong nhóm thí nghiệm được chia cho kết quả về sự dịch chuyển đỉnh trong nhóm đối chứng âm (Tỷ lệ cường độ huỳnh quang trung bình = Tỷ lệ MFI: MFI của kháng thể thử nghiệm/MFI của kháng thể thứ hai).

Kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 31 dưới đây:

Bảng 31

Tỷ lệ MFI

Dòng tế bào			kháng HER2	HER2x1A10	HER2x1A12
NCI-N87	Dạ dày	ATCC, CRL-5822	104	139	145
BT-474	Vú	ATCC, HTB-20	81	102	90
Calu-3	Phổi	ATCC, HTB-55	74	82	82
HCC1954	Vú	ATCC, CRL-2338	32	40	42
JIMT1	Vú	DSMZ, ACC 589	26	27	25
HT29	Ruột kết	ATCC, HTB-38	6,1	6,0	7,4
MCF-7	Vú	ATCC, HTB-22	5,2	4,9	5,8
MDA-MB231	Vú	ATCC, HTB-26	1,2	1,4	1,6
H929	MM	ATCC, CRL-9068	0,9	1,4	1,4
Jurkat	ALL	ATCC, TIB-152	1,0	1,3	1,6

(Tỷ lệ MFI: MFI của kháng thể thứ nhất / MFI của kháng thể thứ hai)

Như được thể hiện trong Bảng 31, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm có thể liên kết với protein HER2 của người được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 5. Ái lực liên kết của BsAb với 4-1BB (SPR)

Trong thí nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được bắt giữ riêng rẽ trên dòng chảy tế bào 2, 3 và 4, giữ dòng chảy tế bào 1 làm tham chiếu, trên chip cảm biến CM5 Biocore® series S (GE Healthcare, BR100530) mà kháng thể kháng Fab của người (GE Healthcare, 28958325) đã được cố định trên đó bằng cách ghép nối amin. Protein 4-1BB tái tổ hợp của người (ACROBiosystems, 41B-H5227) được chảy qua chip ở các nồng độ 400, 200, 100, 50,

25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 và 0,78 nM ở 30 µl/phút trong 300 giây, sau đó là pha phân ly 400 giây. Quá trình tái tạo được thực hiện với Glyxin-HCl 10 mM (độ pH 2,0) (GE Healthcare, BR100355).

Kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 32 dưới đây:

Bảng 32

Kháng thể	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
HER2(WT)x1A10 M12	2,11E-09	2,55E+05	5,38E-04
HER2(NA)x1A10 M12	2,35E-09	2,69E+05	6,33E-04
HER2(WT)x1A12 M1	1,24E-08	6,57E+04	8,11E-04
HER2(NA)x1A12 M1	1,38E-08	6,74E+04	9,27E-04

Như được thể hiện trong Bảng 32, các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm đều thể hiện ái lực liên kết 4-1BB cao.

Ví dụ 6. Hoạt hóa tín hiệu 4-1BB

6.1. BsAb so với kháng thể đặc hiệu đơn

Trong ví dụ này, để đo mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB, dòng tế bào GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega), được cải biến di truyền để biểu hiện ổn định 4-1BB của người và luciferaza xuôi dòng của yếu tố đáp ứng, được sử dụng làm tế bào hiệu ứng, và tế bào ung thư biểu hiện hoặc không biểu hiện HER2 được sử dụng làm tế bào đích. Nói ngắn gọn, NCI-N87 (biểu hiện HER2; $2,5 \times 10^4$ tế bào) hoặc MDA-MB-231 (không biểu hiện HER2; $2,5 \times 10^4$ tế bào) làm tế bào đích được cấy trong đĩa thử nghiệm 96 giếng và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thử nghiệm, kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 (ví dụ 3) cần được thử nghiệm và tế bào Jurkat hiệu ứng ($2,5 \times 10^4$ tế bào) được bổ sung vào đĩa. Sau 6 giờ ủ, chất phản ứng Bio-Glo™ (Promega) được bổ sung và độ phát quang được đo bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 4a (dòng tế bào NCI-N87) và Fig. 4b (dòng tế bào MDA-MB-231) dưới đây. Trên Fig. 4a và Fig. 4b, BMUR (Urelumab của BMS, patent Mỹ số 7,288,638) chỉ kháng thể kháng 4-1BB được sử dụng để so sánh hoạt tính chủ vận. Như được thể hiện trên Fig. 4a và Fig. 4b, kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 dẫn đến sự hoạt hóa mạnh tín hiệu 4-1BB chỉ khi được nuôi cấy đồng thời với tế bào biểu hiện HER2 cao. Kháng thể đơn dòng kháng 4-1BB được liên kết ngang với Fc thể hiện hoạt tính rất thấp.

6.2. Hoạt hóa 4-1BB ở các tế bào biểu hiện HER2 (I)

Trong ví dụ này, để đo mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB, dòng tế bào GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega), được cải biến di truyền để biểu hiện ổn định 4-1BB của người và luciferaza xuôi dòng của yếu tố đáp ứng được sử dụng làm tế bào hiệu ứng, và tế bào ung thư biểu hiện hoặc không biểu hiện HER2 được sử dụng làm tế bào đích. Nói ngắn gọn, các tế bào ung thư biểu hiện HER2 (NCI-N87, Calu-3, HCC1954, JIMT1, ZR-75-1) hoặc không biểu hiện HER2 (MDA-MB231, MCF-7, A431, BxPC-3) làm tế bào đích (mỗi loại $2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng) được cấy trong đĩa thử nghiệm 96 giếng và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thử nghiệm, kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 (ví dụ 3; 15 nM, pha loãng 4 lần hoặc 20 nM, pha loãng 5 lần hoặc 100 nM, pha loãng 5 lần) cần được thử nghiệm và tế bào Jurkat hiệu ứng ($2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng) được bổ sung vào đĩa. Sau 6 giờ ủ, chất phản ứng Bio-Glo™ được bổ sung và độ phát quang được đo bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 5a đến Fig. 5i. Như được thể hiện trên Fig. 5a đến Fig. 5i, kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 dẫn đến sự hoạt hóa mạnh tín hiệu 4-1BB chỉ khi được nuôi cấy đồng thời với tế bào biểu hiện HER2.

6.3. Hoạt hóa 4-1BB ở các tế bào biểu hiện HER2 (II)

Trong ví dụ này, để đo mức hoạt hóa tín hiệu 4-1BB, dòng tế bào GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega), được cải biến di truyền để biểu hiện ổn định 4-1BB của người và luciferaza xuôi dòng của yếu tố đáp ứng được sử dụng làm tế bào hiệu ứng. Nói ngắn gọn, tế bào đích biểu hiện HER2 (Calu-3 hoặc HCC1954; $2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng) được cấy trong đĩa thử nghiệm 96 giếng và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thử nghiệm, kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 (ví dụ 3; 20 nM, pha loãng 5 lần hoặc 133 nM, pha loãng 6 lần) cần được thử nghiệm và tế bào Jurkat hiệu ứng ($2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng) được bổ sung vào đĩa. Sau 6 giờ ủ, chất phản ứng Bio-Glo™ được bổ sung và độ phát quang được đo bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 6a và Fig. 6b. Như được thể hiện trên Fig. 6a và Fig. 6b, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm dẫn đến sự hoạt hóa mạnh tín hiệu 4-1BB chỉ khi được nuôi cấy đồng thời với tế bào biểu hiện HER2 cao.

6.4. Định lượng HER2

Mức biểu hiện HER2 trên bề mặt tế bào được định lượng ở các dòng tế bào ung thư khác nhau sử dụng kit định lượng QIFIKIT (Dako) theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Nói ngắn gọn, tế bào được nhuộm bằng kháng thể đơn dòng kháng HER2 chuột nhắt không được đánh dấu (R&D systems) hoặc đối chứng isotyp IgG2b của chuột nhắt đã tinh chế (R&D systems) ở nồng độ làm bão hòa. Sau khi rửa, tế bào đã nhuộm và hạt hiệu chuẩn từ kit được đánh dấu đồng thời với cùng kháng thể thứ cấp của dê kháng IgG chuột nhắt được liên hợp với FITC từ kit. Tế bào được đánh dấu và hạt hiệu chuẩn được phân tích trên máy đo tế bào dòng chảy. Hồi quy tuyến tính được thực hiện sử dụng giá trị MFI từ hạt hiệu chuẩn. ABC (khả năng liên kết kháng thể - Antibody-Binding Capacity) được ngoại suy từ đường hồi quy này và sABC (ABC riêng - specific ABC) được xác định bằng cách lấy ABC của kháng thể kháng HER2 trừ đi ABC của kháng thể đối chứng isotyp.

Kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 33.

Bảng 33

Dòng tế bào		HER2 sABC
NCI-N87	ATCC, CRL-5822	1.755.033
Calu-3	ATCC, HTB-55	734.348
HCC1954	ATCC, CRL-2338	497.805
JIMT1	DSMZ, ACC 589	93.113
ZR-75-1	ATCC, CRL-1500	25.360
A431	ATCC, CRL-1555	13.130
MCF-7	ATCC, HTB-22	8.525
MDA-MB231	ATCC, HTB-26	3.841
BxPC-3	ATCC, CRL-1687	2.013

Như được thể hiện trong Bảng 33, sABC của 9 dòng tế bào ung thư được xác định.

6.5. Tương quan giữa HER2 sABC và sự truyền tín hiệu NF-kB được cảm ứng bởi 4-1BB

Mức HER2 được đo trong ví dụ 6.4 được chuẩn hóa đến mức HER2 được biểu hiện bởi HCC1954. Mức hoạt hóa 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép được xác định là mức tối đa của thay đổi gấp số lần so với đối chứng trong thử nghiệm báo cáo 4-1BB NF-kB luciferaza của ví dụ 6.2. Diện tích chung chỉ ra khoảng tin cậy cho hiệu chuẩn tuyến tính.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 7. Như được thể hiện trên Fig. 7, sự hoạt hóa 4-1BB bởi kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 thể hiện tương quan mạnh với sự biểu hiện của HER2 trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 7. Đáp ứng miễn dịch tế bào T

7.1. Tác động đến sự giải phóng xytokin

Để thử nghiệm khả năng của kháng thể đặc hiệu kép trong việc kích thích đáp ứng tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC), nồng độ của IFN-gama trong dịch nổi được đo. PBMC của người được nuôi cấy đồng thời với tế bào ung thư HCC1954 biểu hiện HER2 khi có mặt kháng thể kháng CD3 của người (BioLegend, 5ug/mL) và kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ 3; 3 ug/mL, pha loãng 4 lần) được thử nghiệm. Sau khi nuôi cấy trong buồng được làm ẩm với điều kiện CO₂ 5% ở 37°C trong 72 giờ, nồng độ của IFN-gama trong dịch nổi được đo bằng Kit Quantikin IFN-gama của người (R&D system, SIF50).

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 8a đến Fig. 8d. Như được thể hiện trên Fig. 8a đến Fig. 8d, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép được thử nghiệm đều cảm ứng sự giải phóng xytokin nhiều hơn so với tổ hợp của mỗi kháng thể đơn dòng khi có mặt tế bào biểu hiện HER2 cao.

7.2. Tác động đến sự sinh trưởng của tế bào đích

Để thử nghiệm khả năng kháng thể đặc hiệu kép trong việc kích thích đáp ứng PBMC của người, thử nghiệm dung giải tế bào đích được sử dụng. PBMC của người được nuôi cấy đồng thời với tế bào ung thư HCC1954 biểu hiện HER2 khi có mặt kháng thể kháng CD3 của người (BioLegend, 5ug/mL) và kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ 3; 3 ug/mL, pha loãng 4 lần) cần được thử nghiệm. Sau khi nuôi cấy trong buồng được làm ẩm với điều kiện CO₂ 5% ở 37°C trong 72 giờ, tỷ lệ sống sót của HCC1954 được đo bằng kit đếm tế bào 8 (Dojindo, CK04-20).

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 9a đến Fig. 9d. Như được thể hiện trên Fig. 9a đến Fig. 9d, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép được thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư vượt trội hơn so với tổ hợp của mỗi kháng thể đặc hiệu đơn khi có mặt tế bào biểu hiện HER2 cao.

Ví dụ 8. Hiệu lực kháng khối u *in vivo* ở chuột nhắt được ghép hPBMC mang HCC1954

8.1. Hoạt tính kháng khối u

Để thử nghiệm hiệu lực kháng khối u *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2, chuột nhắt NSG được nhân hóa PBMC được sử dụng. Chuột nhắt NSG 7 tuần tuổi (The Jackson Laboratory) được tiêm trong tĩnh mạch 1×10^7 PBMC của người và tế bào ung thư HCC1954 (1×10^7 tế bào/chuột nhắt trong dung dịch PBS:Matrigel = 1:1) được tiêm truyền vào hông bên phải của chuột nhắt. Chuột nhắt được nhân hóa mang HCC1954 được phân vào mỗi nhóm thử nghiệm ($n=12$ /nhóm) vào ngày 2 sau khi cấy khối u. Chuột nhắt được dùng trong tĩnh mạch kháng thể đối chứng IgG1 của người, kháng thể kháng 4-1BB hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 hai lần một tuần với liều bằng 10 mg/kg hoặc 7,5 mg/kg trong 4 tuần. Kháng thể được tiêm hai lần một tuần và kích thước khối u được đo bằng thước cặp điện tử.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 10. Như được thể hiện trên Fig. 10, tất cả các kháng thể đặc hiệu kép được thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính kháng khối u vượt trội so với kháng thể kháng 4-1BB tiêu chuẩn (Urelumab, BMS) cũng như kháng thể đối chứng.

8.2. Phân tích lympho bào thâm nhiễm khối u (tumor-infiltrating lymphocytes - TIL)

Để đánh giá TIL, lát cắt mô khối u từ chuột nhắt được ghép hPBMC mang HCC1954 đã được nhúng trong parafin, cố định bằng formalin được nhuộm miễn dịch bằng kháng thể kháng hCD45 (chất đánh dấu lympho bào của người, Cell Signaling Technology), kháng thể kháng hCD4 (chất đánh dấu lympho bào T hỗ trợ của người, Cell Signaling Technology), kháng thể kháng hCD8 (chất đánh dấu lympho bào T gây độc tế bào của người, Cell Signaling Technology), và kháng thể kháng hCD16 (chất đánh dấu tế bào diệt tự nhiên của người, Cell Signaling Technology). Kỹ thuật mô hóa học miễn dịch được thực hiện bằng cách áp dụng kit phát hiện avidin-biotin (Vector Laboratories), để đo mỗi tế bào dương tính với chất đánh dấu. Nói ngắn gọn, lát cắt mô khối u đã được nhúng parafin, cố định formalin được khử parafin và hydrat hóa lại. Thu hồi kháng nguyên từ lát cắt mô đã hydrat hóa lại được thực hiện bằng cách đặt các lát cắt này trong đệm EDTA (độ pH 9,0). Sau khi rửa bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và ủ với dung dịch phong bế trong 30 phút, lát cắt được ủ với kháng thể sơ cấp ở 4°C qua đêm. Kit Vectastain Elite ABC (Vector Lab) và quy trình cung cấp bởi nhà sản xuất

được sử dụng để nhuộm miễn dịch. Sau đó các lát cắt này được xử lý bằng phản chất nhuộm bằng hematoxylin, được loại nước bằng cách sử dụng các rượu phân độ và xylen, và được gắn cố định bằng Permount.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 11. Như được thể hiện trên Fig. 11, kháng thể đặc hiệu kép Her2x41-BB tăng cường một cách hiệu quả sự thâm nhiễm của các tế bào miễn dịch bao gồm tế bào CD45⁺, tế bào T CD4⁺, tế bào T CD8⁺ và tế bào NK vào mô khối u, so với BMUR (Urelumab).

Ví dụ 9. Hiệu lực kháng khối u *in vivo* ở chuột nhắt đưa gen vào (knock-in) 4-1BB

9.1. Hoạt tính kháng khối u

Hiệu lực kháng khối u *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được đánh giá ở chuột nhắt đưa gen vào 4-1BB (Biocytogen) mang khối u HER2/MC38 của người (Biocytogen). Chuột nhắt được nhân hóa mang khối u được chia ngẫu nhiên vào mỗi nhóm thử nghiệm (n=5/nhóm) vào ngày 4 sau khi ghép khối u dựa trên thể tích khối u (xấp xỉ 80 mm³). Kháng thể IgG1 của người, Trastuzumab (kháng thể kháng HER2), và kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 (HER2(WT)x1A10 M12, HER2(NA)x1A10 M12) lần lượt được dùng trong màng bụng hai lần một tuần với liều 10 mg/kg hoặc 7,5 mg/kg cho chuột nhắt trong 4 tuần. Kích thước khối u được đo bằng thước cặp điện tử.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 12. Như được thể hiện trên Fig. 12, kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 thể hiện hiệu lực kháng khối u vượt trội so với Trastuzumab ở khối u HER2/MC38 của người. Đặc biệt là, các khối u của tất cả chuột nhắt được điều trị bằng HER2(WT)x1A10 M12 đã được chữa khỏi.

9.2. Đánh giá tác động của tế bào T trí nhớ đặc hiệu khối u

Chuột nhắt đã được chữa khỏi bằng HER2(WT)x1A10 M12 được thử thách lại với tế bào khối u HER2/MC38 của người (Biocytogen) và tế bào khối u B16 F10 (ATCC) ở cả hai hông vào ngày 63 sau khi tiêm khối u. Chuột nhắt không được dùng bất kỳ thuốc nào trong giai đoạn nghiên cứu thử thách lại. Kích thước khối u được đo bằng thước cặp điện tử.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 13. Như được thể hiện trên Fig. 13, không quan sát được sự phát triển của khối u HER2/MC38 của người, trong khi khối u B16 F10 phát triển ở chuột nhất đã chữa khỏi bằng việc điều trị HER2(WT)x1A10 M12. Ví dụ 10. Hoạt tính gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) (mạch chính NA so với WT)

10.1. ADCC được trung gian bởi tế bào NK

Trong ví dụ này, tế bào NK CD56⁺ có nguồn gốc từ máu ngoại vi của người được sử dụng làm tế bào hiệu ứng và tế bào HCC1954 biểu hiện HER2 được đánh dấu CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng làm tế bào đích. Các tế bào được nuôi cấy đồng thời với tỷ lệ tế bào hiệu ứng:đích bằng 5:1 với 50 nM kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 (ví dụ 3) ở 37°C. Sau 4 giờ, tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm đo tỷ lệ sống sót cố định được (eBioscience™) và sau đó tỷ lệ tế bào đích chết được phân tích bằng phép đo tế bào dòng chảy.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 14 dưới đây. Như được thể hiện trên Fig. 14, typ IgG1 (WT) của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 thể hiện hiệu quả ADCC nổi bật được trung gian bởi tế bào NK.

10.2. Hoạt hóa tín hiệu 4-1BB phụ thuộc vào sự tiếp hợp FcγRIIb

Trong ví dụ này, tế bào CHO-K1 biểu hiện FcγRIIb (Promega) được cấy trong đĩa thử nghiệm 96 giếng và được nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thử nghiệm, tế bào Jurkat/4-1BB (Promega) được cấy trong đĩa 96 giếng. Tế bào được ủ với chuẩn độ của kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 khi có mặt (phụ thuộc FcγRIIb) hoặc không có mặt (độc lập FcγRIIb) tế bào CHO-K1 biểu hiện FcγRIIb (Promega). Sau 6 giờ cảm ứng, chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo™ Luciferaza được bổ sung và độ phát quang được xác định sử dụng máy đo phát quang SpectraMax L (Molecular Devices). Phân tích đường cong logistic bốn tham số được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism®.

Kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 34 (thử nghiệm sinh học 4-1BB phụ thuộc vào FcγRIIb) và Bảng 35 (thử nghiệm sinh học 4-1BB độc lập FcγRIIb) dưới đây, và Fig. 15a (thử nghiệm sinh học 4-1BB phụ thuộc vào FcγRIIb) và Fig. 15b (thử nghiệm sinh học 4-1BB độc lập FcγRIIb).

Bảng 34

Thử nghiệm sinh học 4-1BB phụ thuộc vào FcγRIIb		
	Số lần cảm ứng (RLU)	EC ₅₀ (nM)
Urelumab	195,5	0,2364
HER2(WT)X1A10 M12	< 2	Không áp dụng
HER2(NA)X1A10 M12	< 2	Không áp dụng
HER2(WT)X1A12 M1	< 2	Không áp dụng
HER2(NA)X1A12 M1	< 2	Không áp dụng

Bảng 35

Thử nghiệm sinh học 4-1BB độc lập FcγRIIb		
	Số lần cảm ứng (RLU)	EC ₅₀ (nM)
Urelumab	15,57	0,5196
HER2(WT)X1A10 M12	< 2	Không áp dụng
HER2(NA)X1A10 M12	< 2	Không áp dụng
HER2(WT)X1A12 M1	< 2	Không áp dụng
HER2(NA)X1A12 M1	< 2	Không áp dụng

Như được thể hiện trong Bảng 34 và Bảng 35, và Fig. 15a và Fig. 15b, nhóm được điều trị bằng Urelumab thể hiện mức chênh lệch RLU (đơn vị phát quang tương đối) cao nhất gấp 13,5 lần và chênh lệch EC₅₀ gấp 2,2 lần theo sự có mặt của tế bào CHO-K1 FcγRIIb. Bốn kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 thể hiện RLU rất thấp so với Urelumab không kể đến sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào CHO-K1 FcγRIIb. Các dữ liệu này thể hiện rằng tất cả các kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 được thử nghiệm có lợi ích tiềm năng so với urelumab, mà có độc tính mạnh trong các thử nghiệm lâm sàng (NCT00309023, NCT00612664, NCT014712210).

Tất cả các tài liệu tham khảo, bao gồm tài liệu công bố, đơn đăng ký cấp patent và patent được trích dẫn ở đây được đưa vào bằng cách viện dẫn ở phạm vi tương tự như thể mỗi tài liệu tham khảo được chỉ ra riêng lẻ và cụ thể để được kết hợp bằng cách viện dẫn và được trình bày toàn bộ ở đây.

Việc sử dụng các thuật ngữ số ít và “ít nhất một” và “một hoặc nhiều” và các từ tham chiếu tương tự trong ngữ cảnh mô tả sáng chế (cụ thể là trong ngữ cảnh của phần

yêu cầu bảo hộ dưới đây) được hiểu là bao gồm cả dạng số ít và số nhiều, trừ khi có quy định khác hoặc trái ngược rõ ràng bởi ngữ cảnh. Việc sử dụng thuật ngữ “ít nhất một” (hoặc “một hoặc nhiều”) sau đó là danh sách của một hoặc nhiều phần tử (ví dụ, “ít nhất một trong số A và B”) được hiểu có nghĩa là một phần tử được chọn từ các phần tử được liệt kê (A hoặc B) hoặc tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều phần tử được liệt kê (A và B), trừ khi được quy định khác ở đây hoặc trái ngược rõ ràng bởi ngữ cảnh. Các thuật ngữ “chứa”, “có”, “bao gồm” và “chứa” được hiểu là thuật ngữ giới hạn mở (tức là, có nghĩa là “bao gồm nhưng không giới hạn ở”), trừ khi có quy định khác. Việc trích dẫn lại các khoảng giá trị ở đây chỉ nhằm đóng vai trò là phương pháp tốc ký đề cập riêng biệt đến giá trị riêng biệt nằm trong khoảng, trừ khi có quy định khác, và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào bản mô tả như thể nó được trích dẫn lại một cách riêng biệt ở đây. Tất cả các phương pháp được mô tả ở đây có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có quy định khác hoặc trái ngược khác rõ ràng bởi ngữ cảnh. Việc sử dụng bất kỳ hoặc tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ mô tả ví dụ (ví dụ, “chẳng hạn như”) được sử dụng ở đây, chỉ nhằm minh họa sáng chế tốt hơn và không đưa ra giới hạn về phạm vi của sáng chế trừ khi được yêu cầu khác. Ngôn ngữ trong bản mô tả này không nên được hiểu là xác định bất kỳ thành phần không được yêu cầu bảo hộ nào là cần thiết với thực tiễn của sáng chế.

Các phương án được ưu tiên theo sáng chế được mô tả ở đây, bao gồm phương thức tốt nhất đã biết với tác giả thực hiện sáng chế. Các biến thể của các phương án được ưu tiên có thể trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật khi đọc phần mô tả ở trên. Các tác giả sáng chế mong đợi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dùng các biến thể này sao cho thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định cho sáng chế được thực hành khác so với được mô tả cụ thể ở đây. Theo đó, sáng chế bao gồm các cải biến và phương án tương đương của đối tượng yêu cầu bảo hộ được thuật lại trong bộ yêu cầu bảo hộ đi kèm với nó như được cho phép bởi luật pháp hiện hành. Hơn nữa, tổ hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả ở trên trong tất cả các biến thể có thể của nó được bao gồm trong sáng chế trừ khi có quy định khác ở đây hoặc trừ khi được nêu trái ngược rõ ràng bởi ngữ cảnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 chứa:

(a) kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và

(b) kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó,

trong đó kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, 2 hoặc 3;

H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, 5 hoặc 6;

H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10 hoặc 11;

L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12 hoặc 13;

L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc 15; và

L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc 17.

2. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 hoặc 29; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 hoặc 88.

3. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60 hoặc 61; và

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 62, 63 hoặc 64.

4. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng 4-1BB hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là scFv kháng 4-1BB của kháng thể kháng 4-1BB.

5. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 4, trong đó scFv kháng 4-1BB còn chứa thành phần liên kết peptit giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

6. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng HER2 là Trastuzumab, Pertuzumab hoặc Trastuzumab emtansine (T-DM1).

7. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

H-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 65;

H-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 66;

H-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 67;

L-CDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 68;

L-CDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 69; và

L-CDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 70.

8. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 71, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 72.

9. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 73 hoặc 74; và

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75.

10. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng HER2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là scFv kháng HER2 của kháng thể kháng HER2.

11. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 10, trong đó scFv kháng HER2 còn chứa thành phần liên kết peptit giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

12. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, chứa:

(a) dạng có chiều dài đầy đủ của kháng thể kháng HER2, và

scFv của kháng thể kháng 4-1BB; hoặc

(b) dạng có chiều dài đầy đủ của kháng thể kháng 4-1BB, và

scFv của kháng thể kháng HER2.

13. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 này chứa:

polypeptit chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, hoặc 84; và

polypeptit chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75.

14. Kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 này chứa:

polypeptit chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 83; và

polypeptit chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75.

15. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, chứa kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và chất mang được dụng.

16. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư được đặc trưng bởi sự biểu hiện của HER2, chứa kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và chất mang được dụng.

17. Dược phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch, chứa kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và chất mang được dụng.

18. Polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

19. Vector tái tổ hợp chứa polynucleotit theo điểm 18.

20. Tế bào tái tổ hợp chứa polynucleotit theo điểm 18.

21. Phương pháp điều chế kháng thể đặc hiệu kép kháng 4-1BB/kháng HER2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, bao gồm bước biểu hiện polynucleotit theo điểm 18 trong tế bào.

Fig. 1a

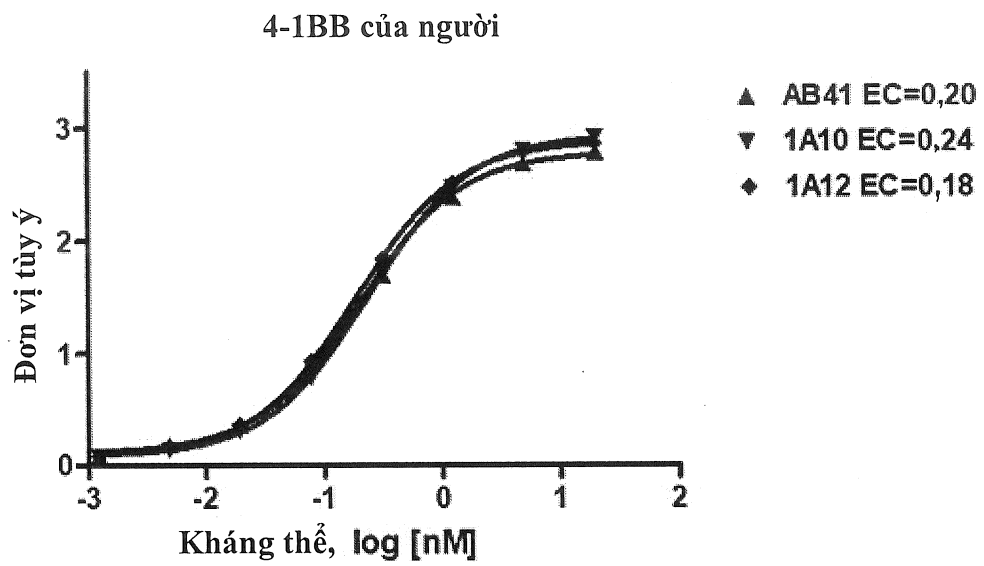


Fig. 1b

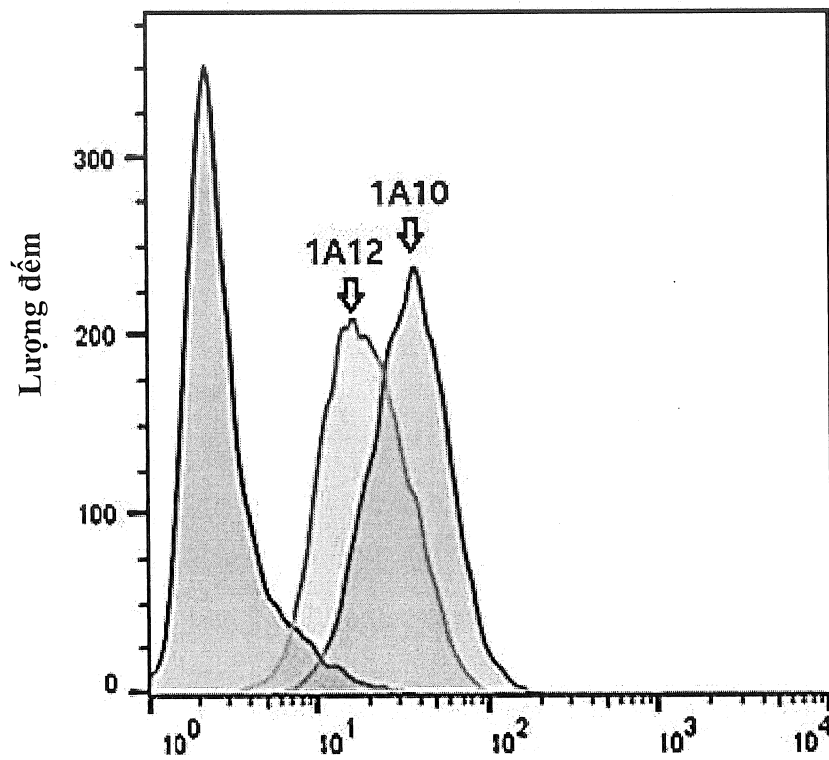


Fig. 2a

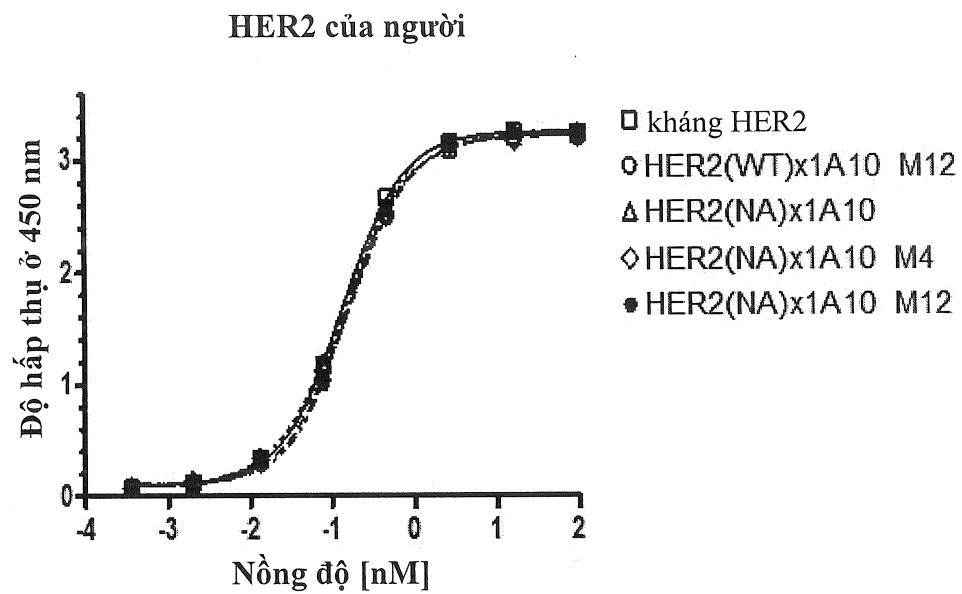


Fig. 2b

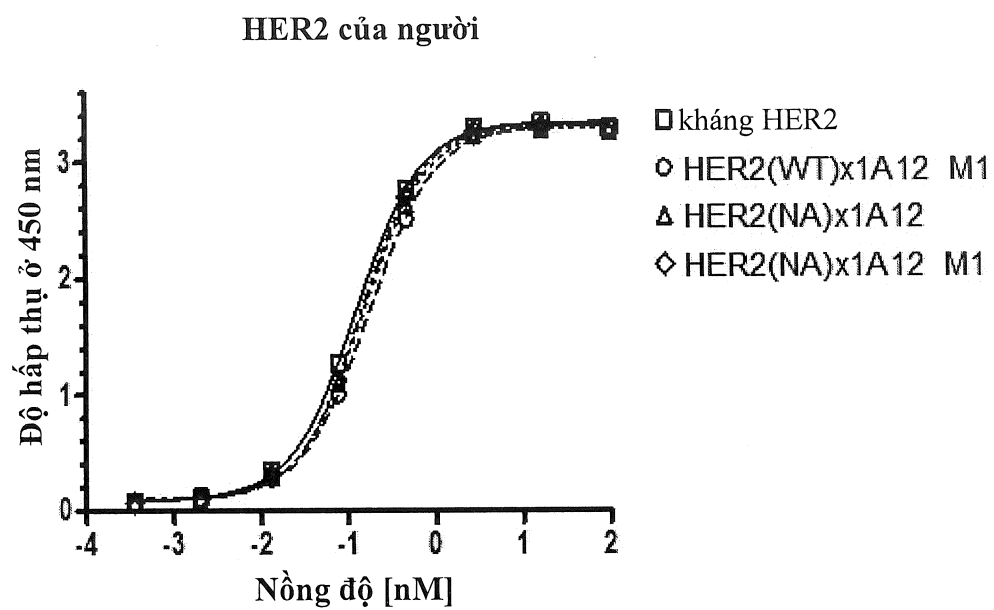


Fig. 3a

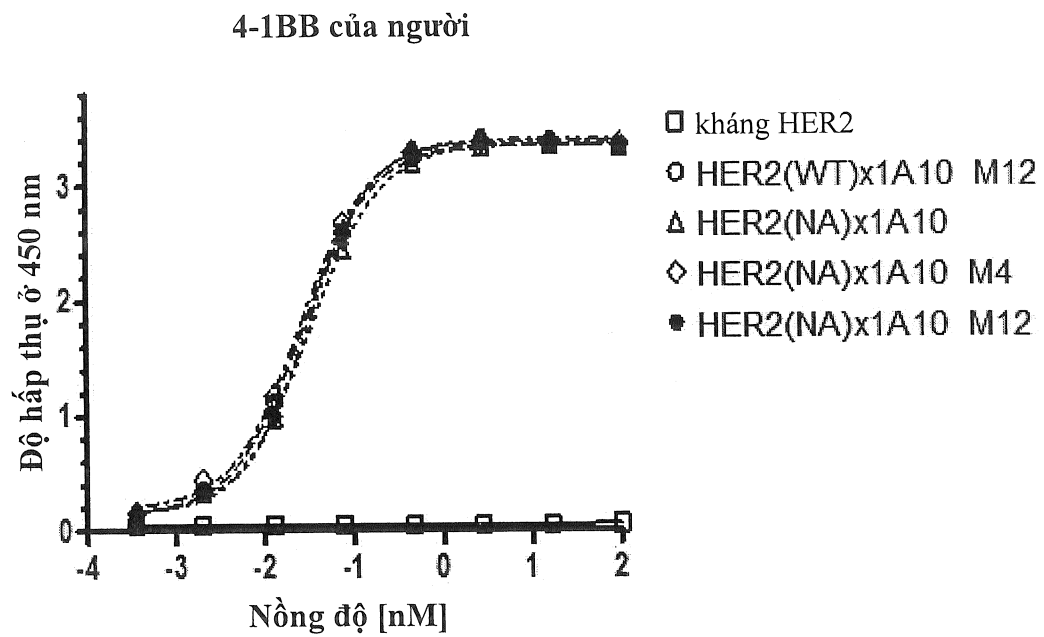


Fig. 3b

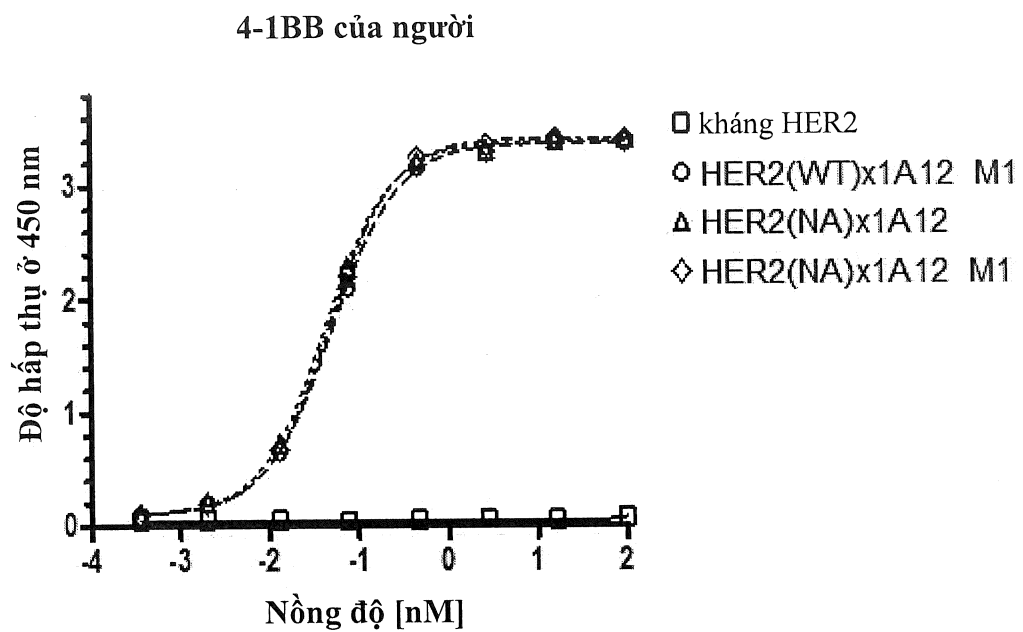


Fig. 4a

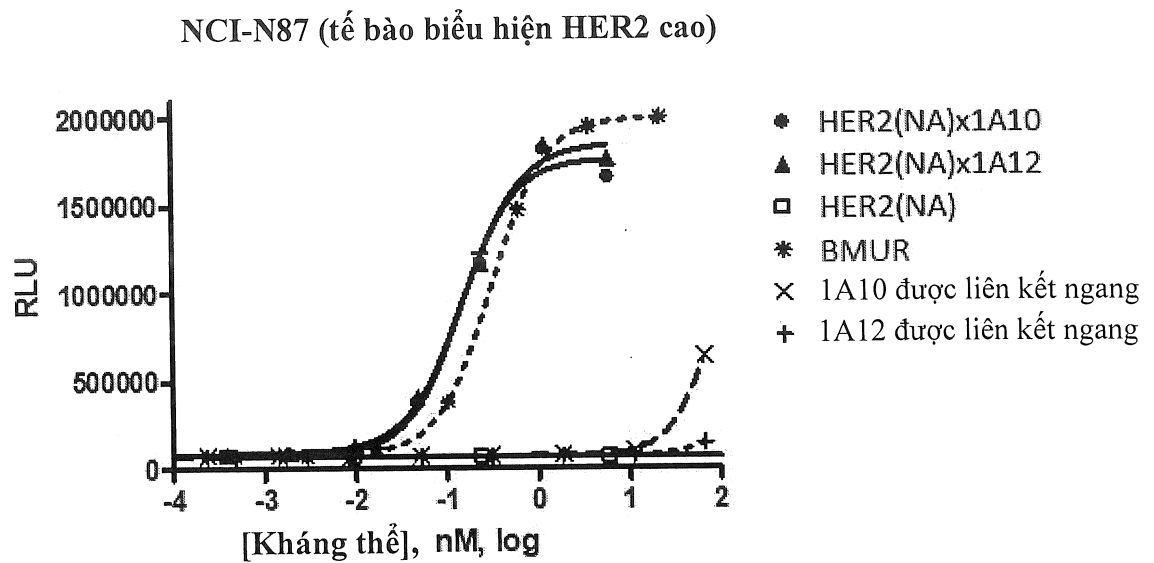
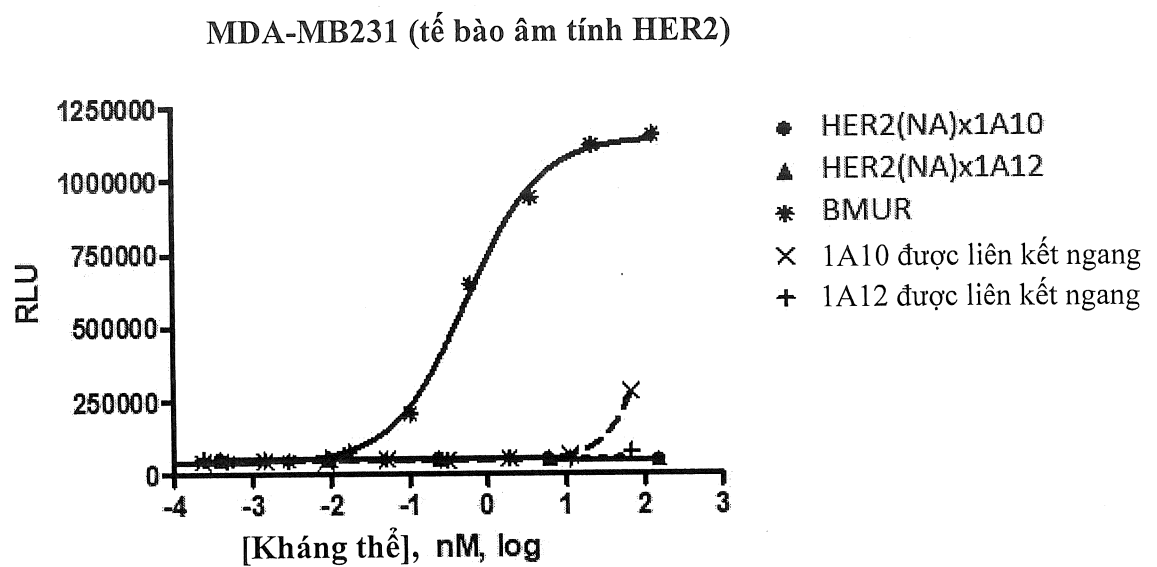


Fig. 4b



5/19

Fig. 5a

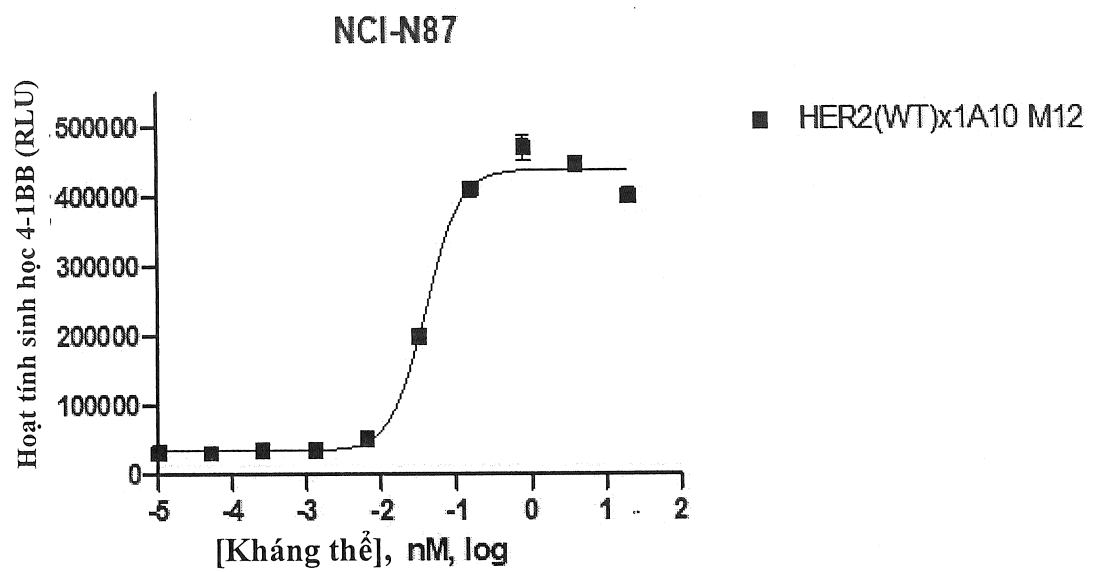


Fig. 5b

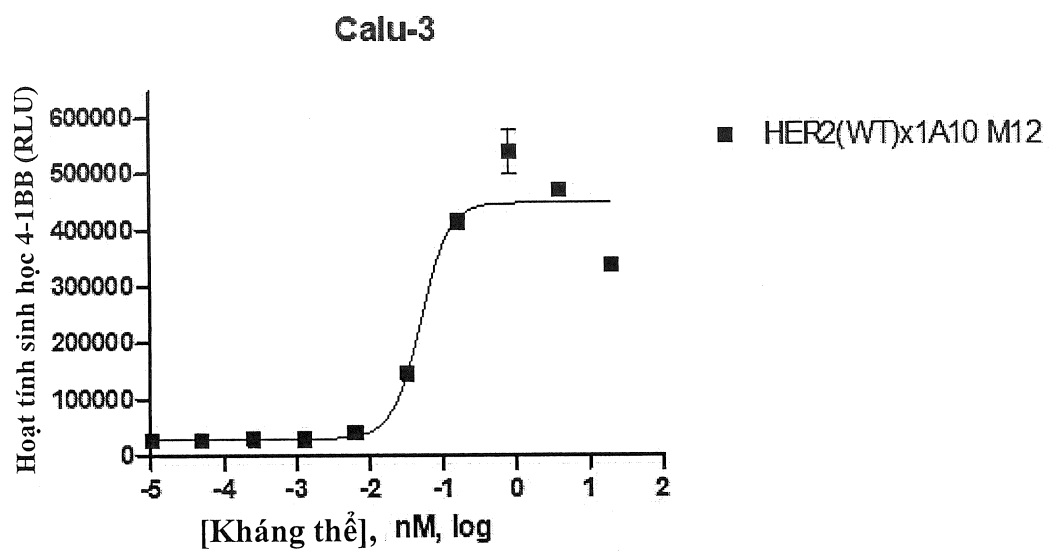


Fig. 5c

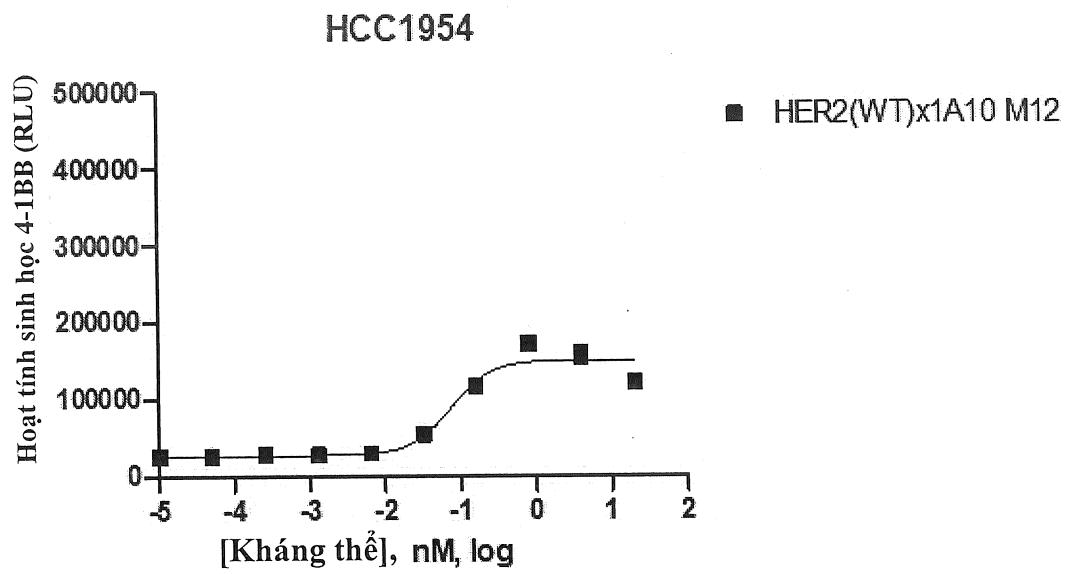
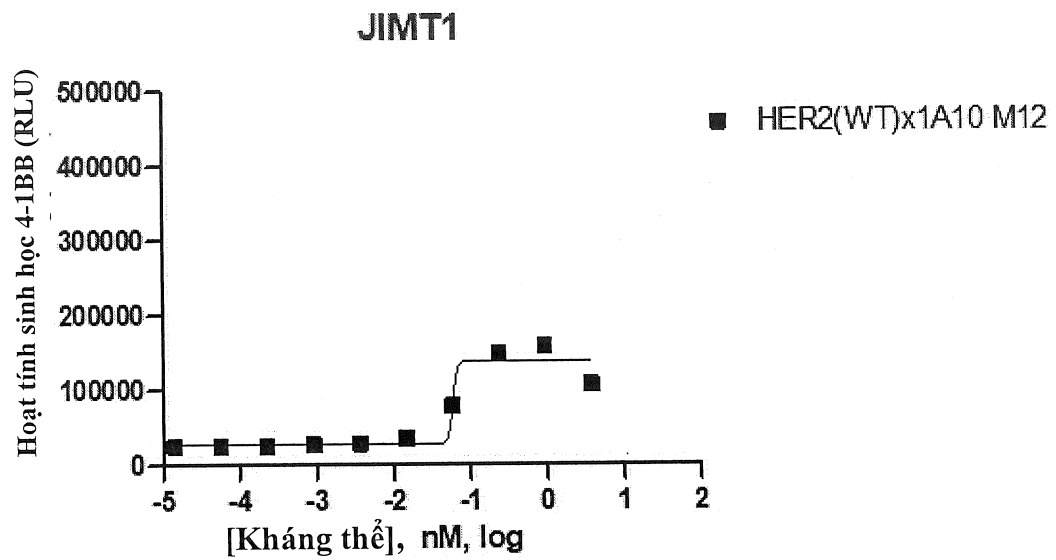


Fig. 5d



7/19

Fig. 5e

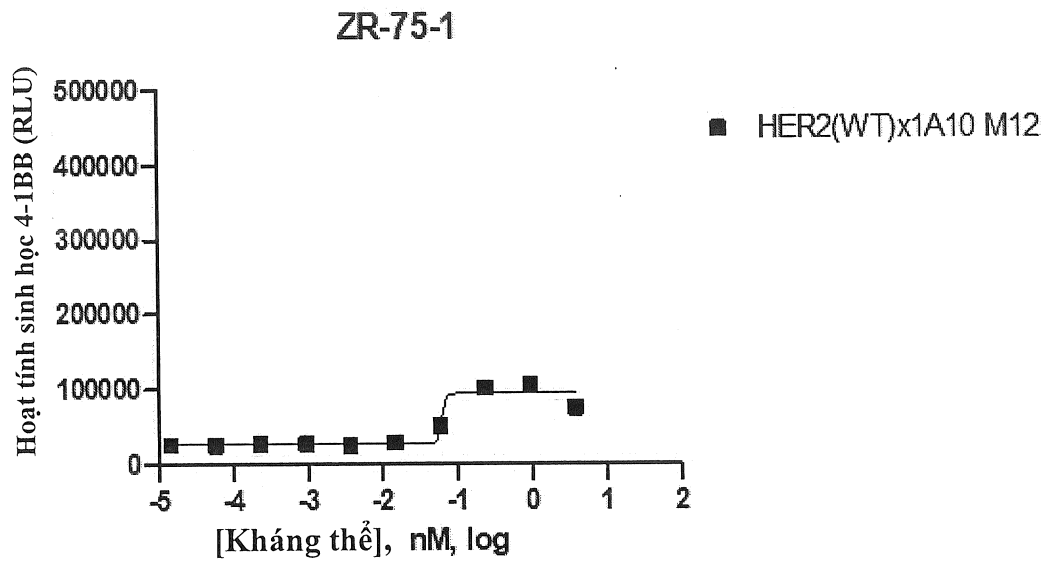
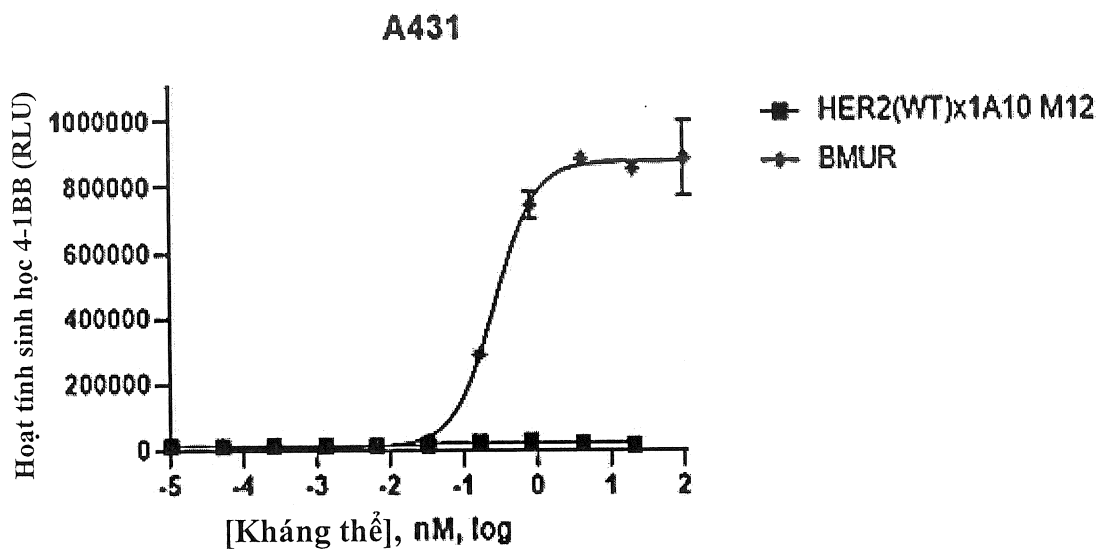


Fig. 5f



8/19

Fig. 5g

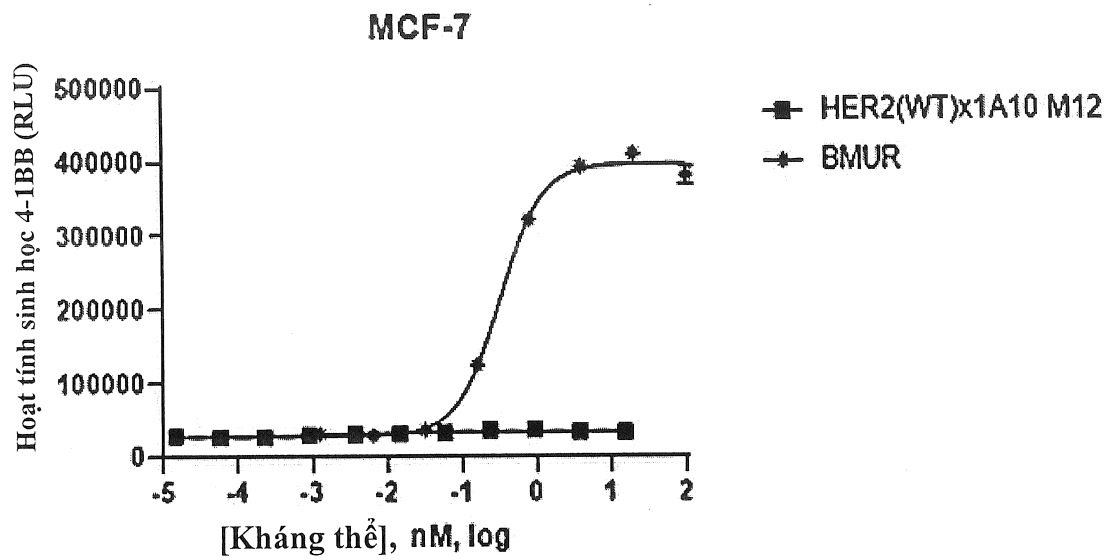
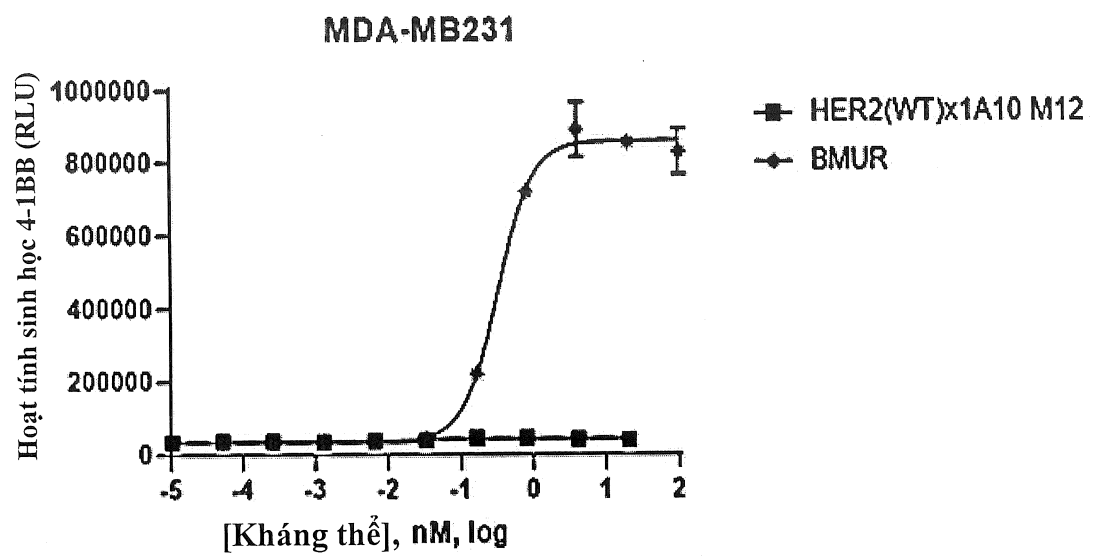


Fig. 5h



9/19

Fig. 5i

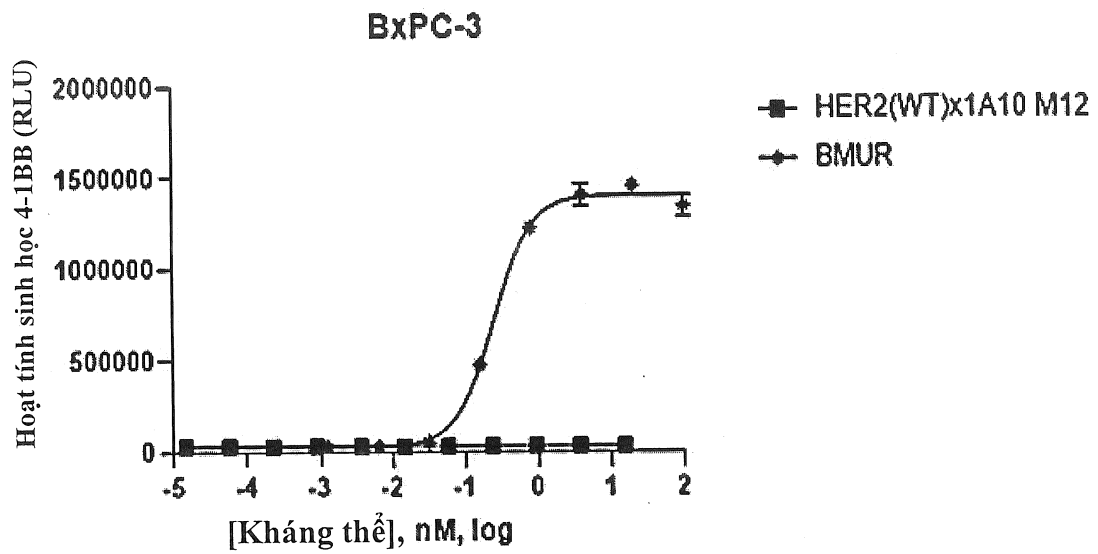
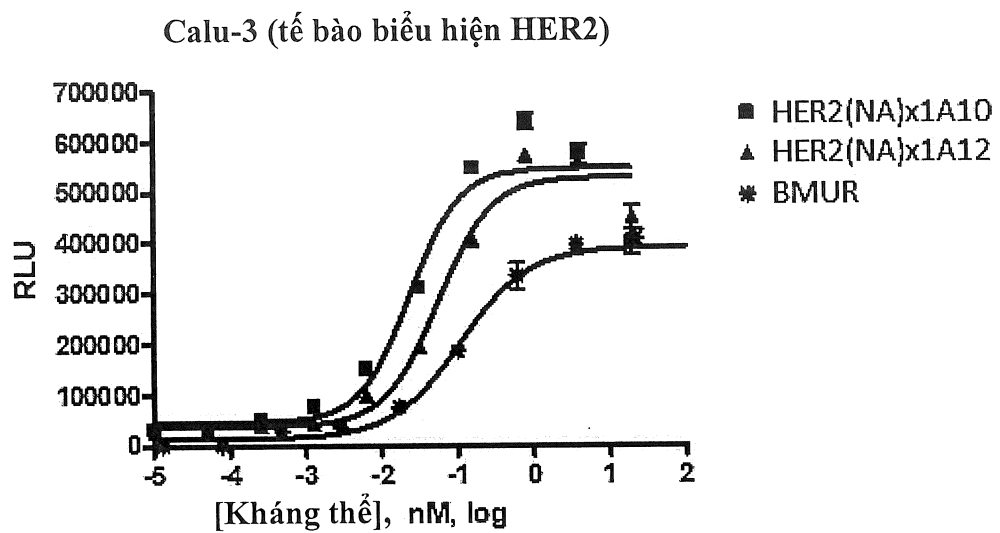


Fig. 6a



10/19

Fig. 6b

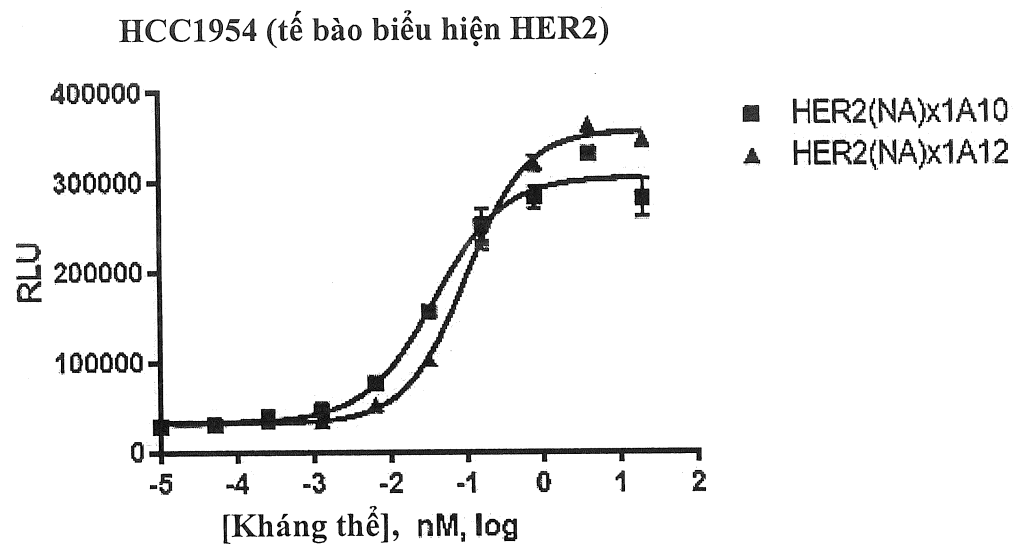
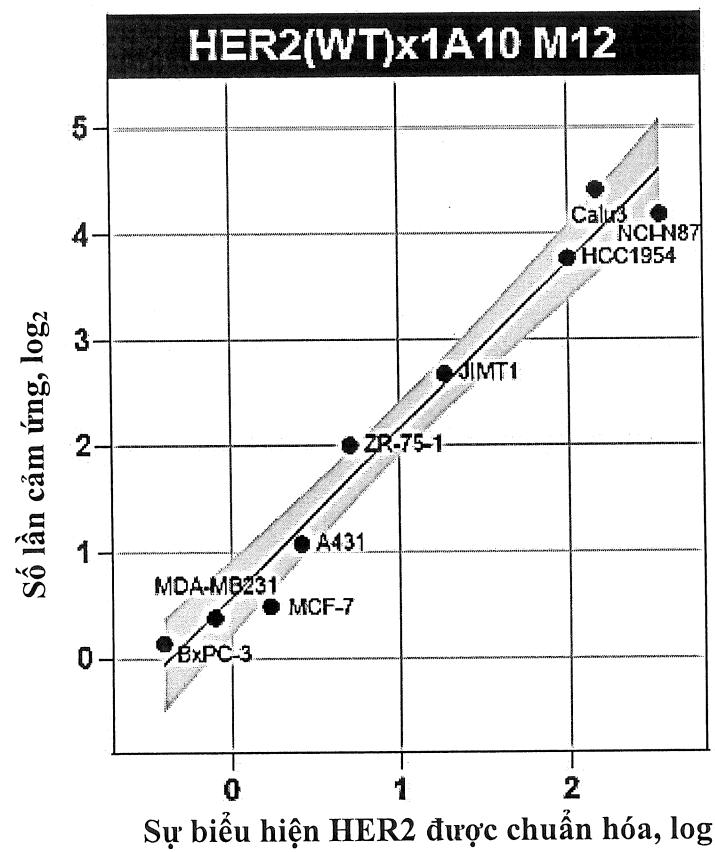


Fig. 7



11/19

Fig. 8a

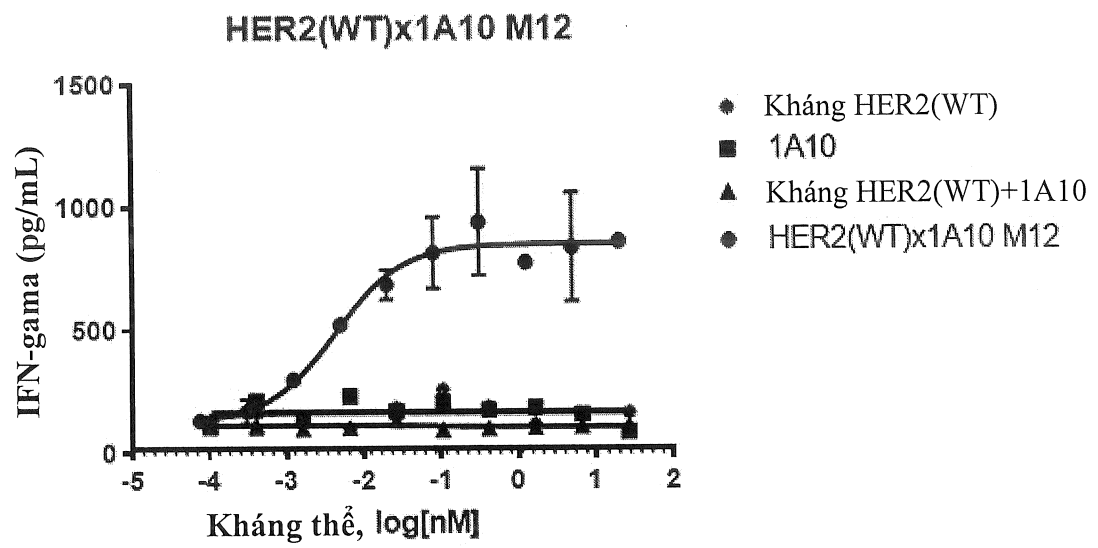
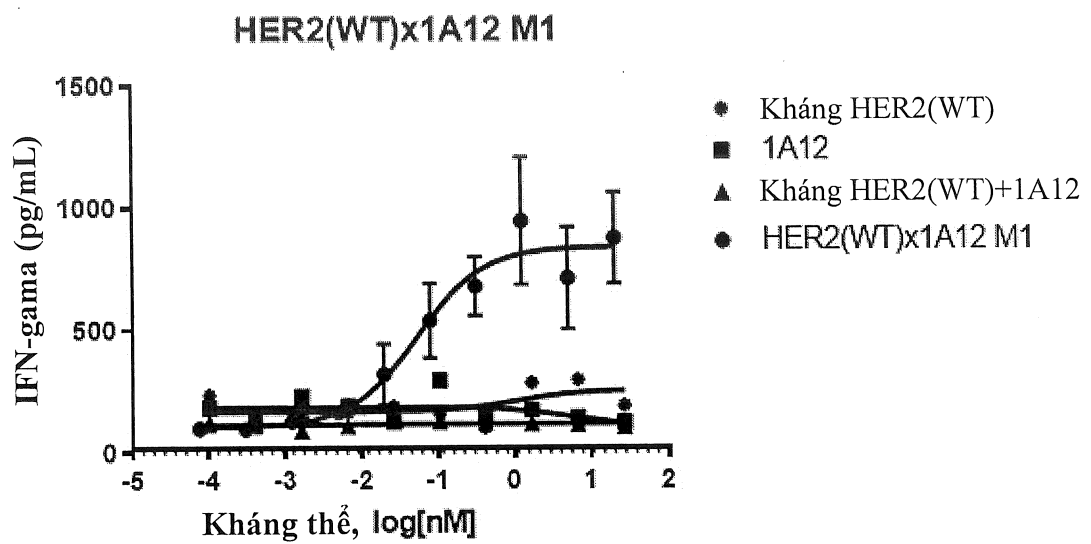


Fig. 8b



12/19

Fig. 8c

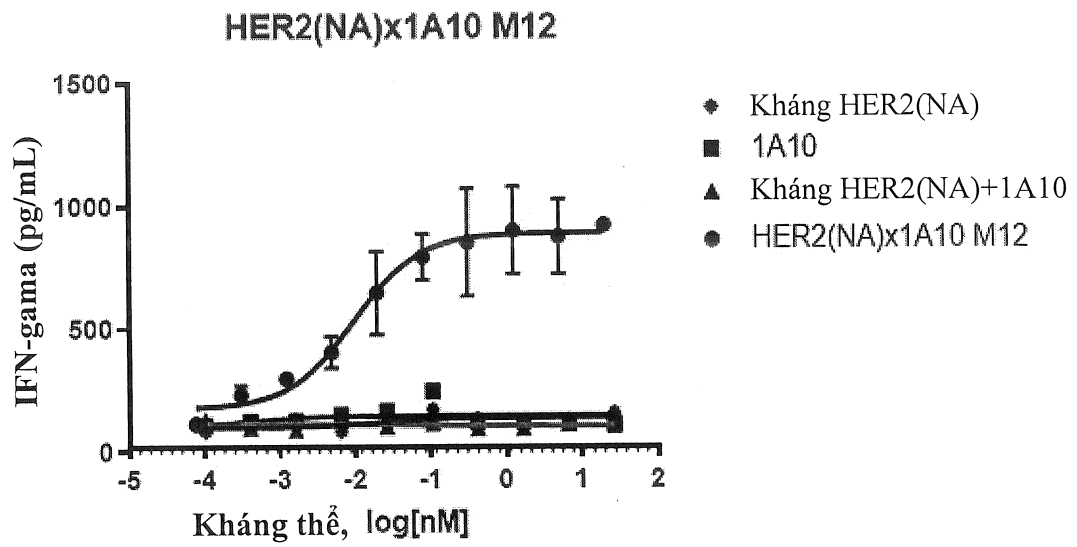


Fig. 8d

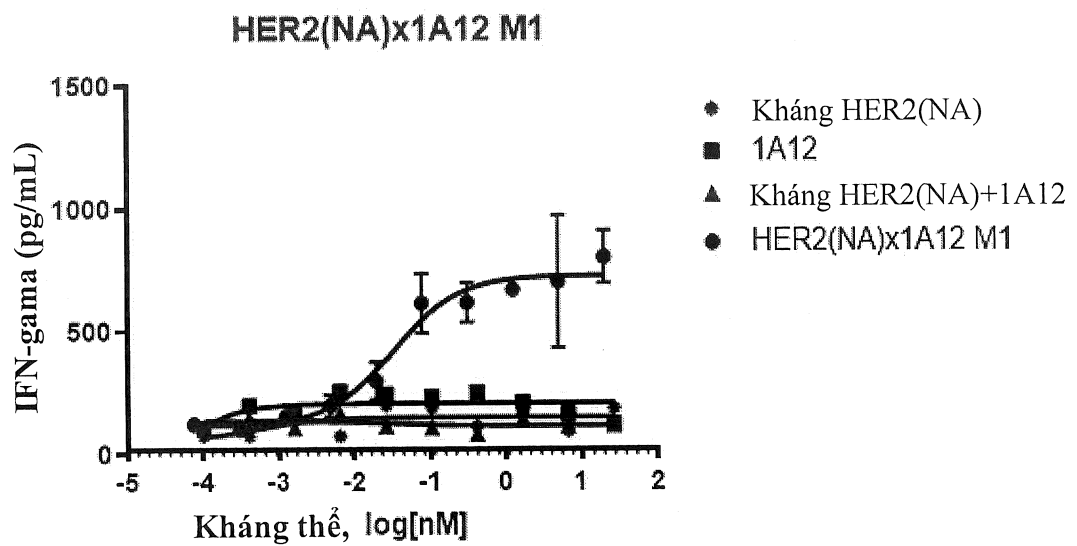


Fig. 9a

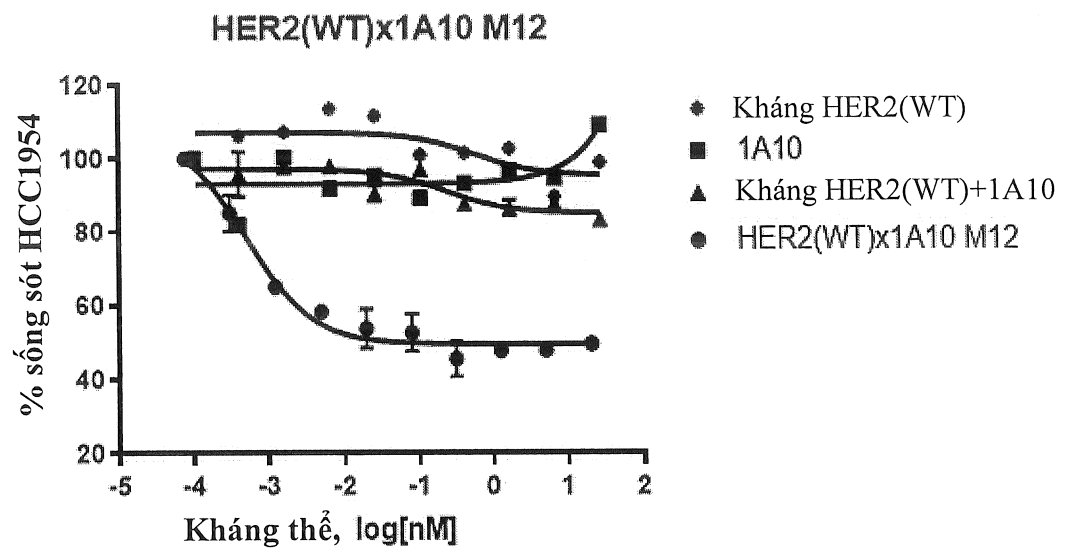
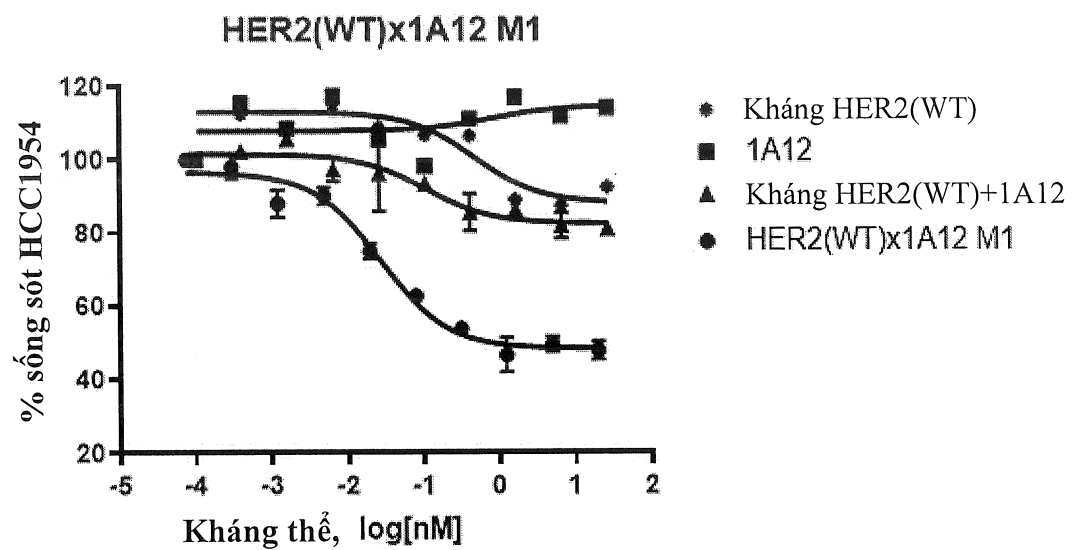


Fig. 9b



14/19

Fig. 9c

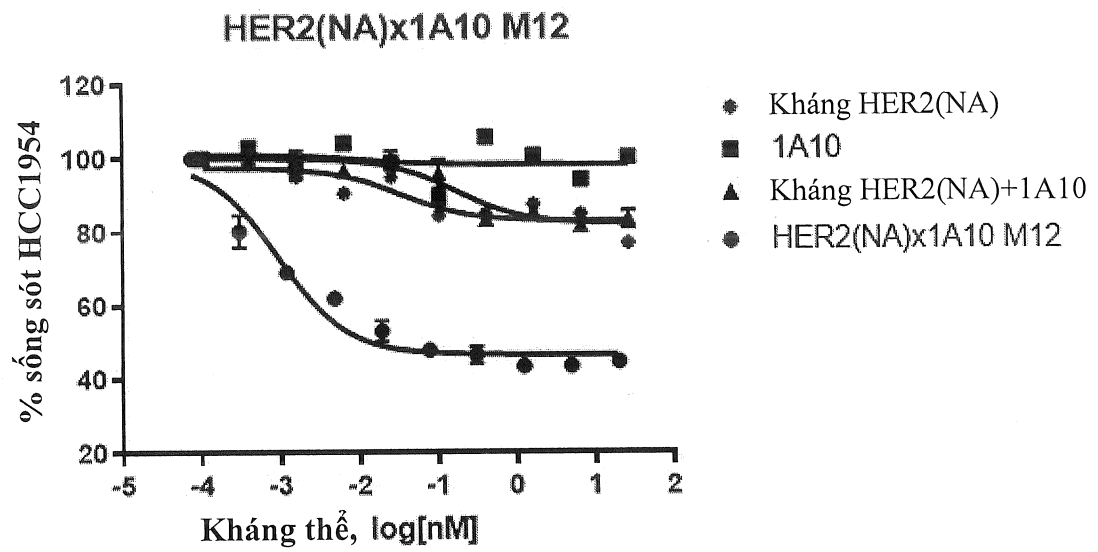
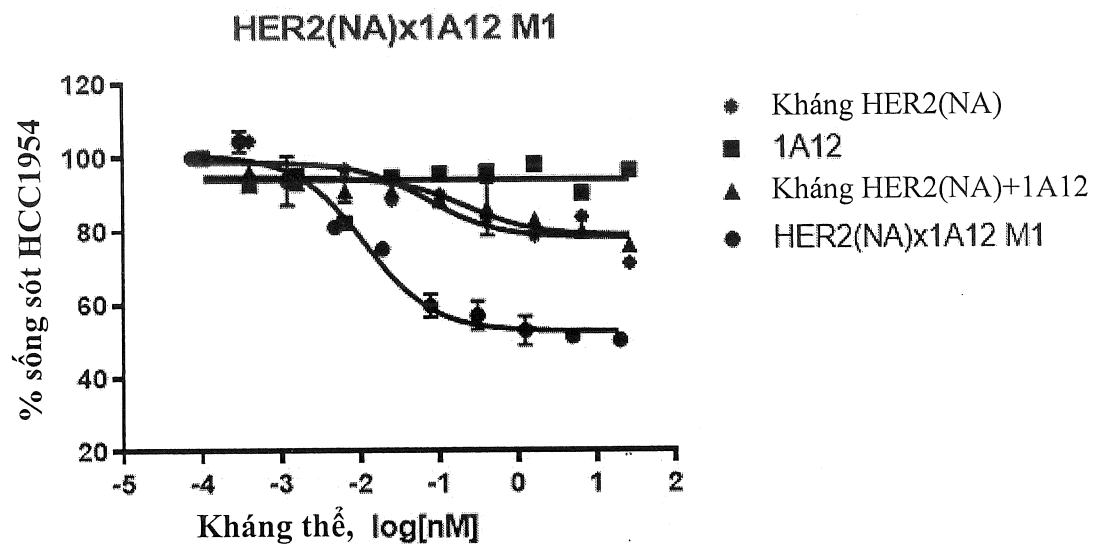


Fig. 9d



15/19

Fig. 10

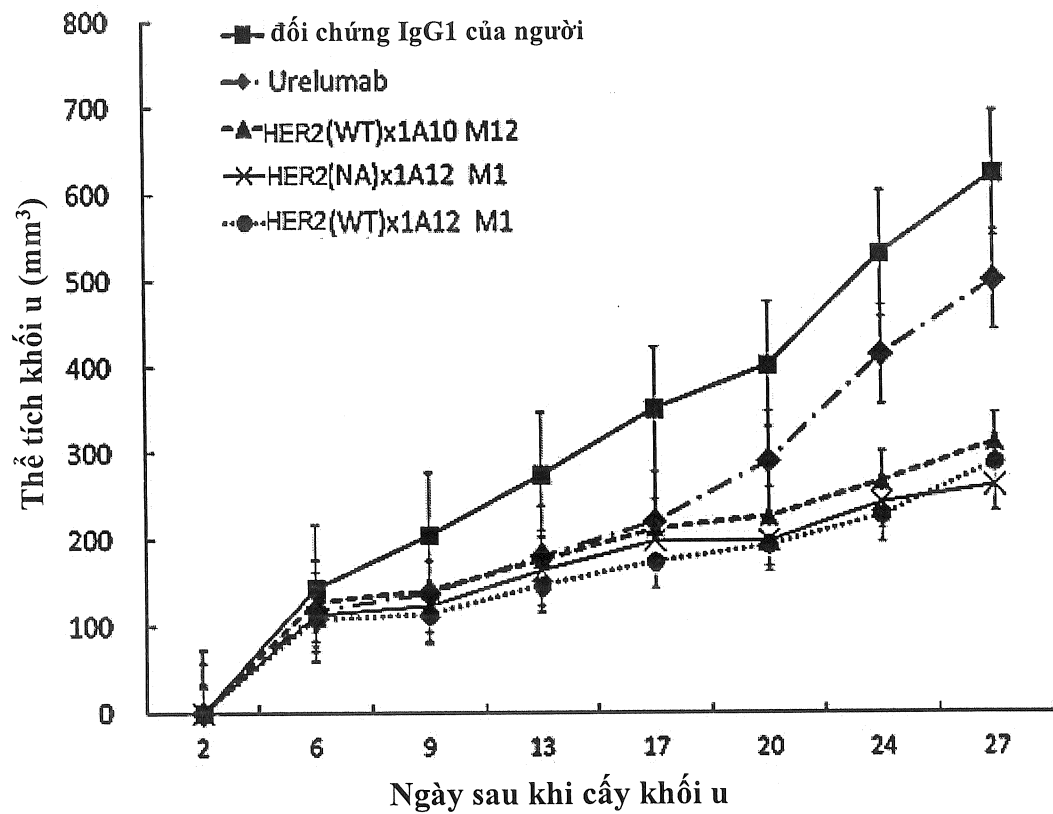
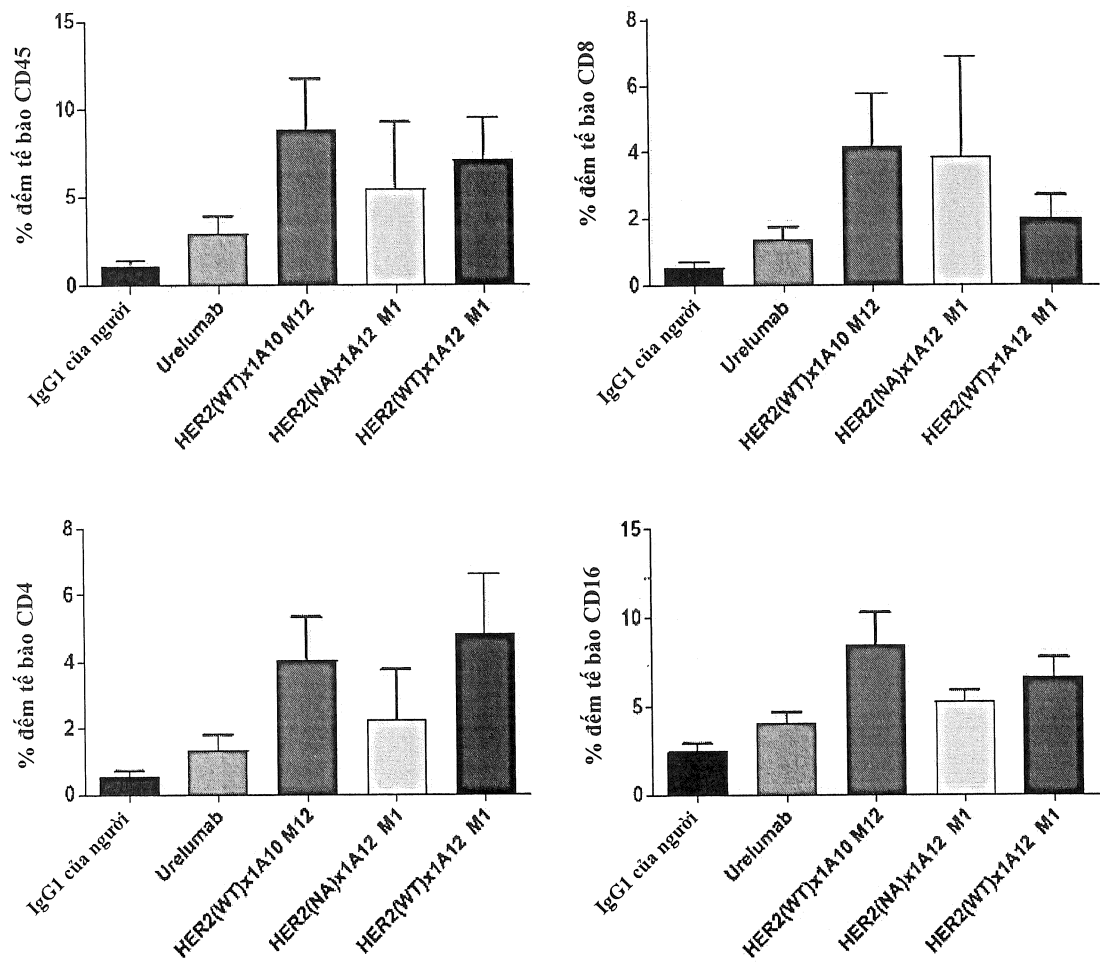
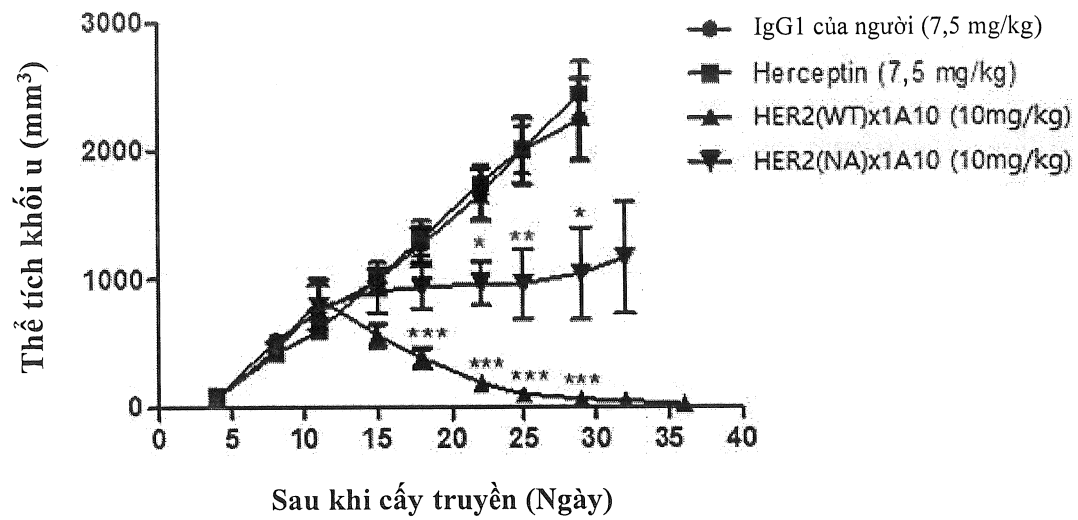


Fig. 11



17/19

Fig. 12



(Trung bình±SEM (n=5/nhóm) ; * p<0,01, ** p<0,01, *** p<0,001 với IgG1 của người (đối chứng))

Fig. 13

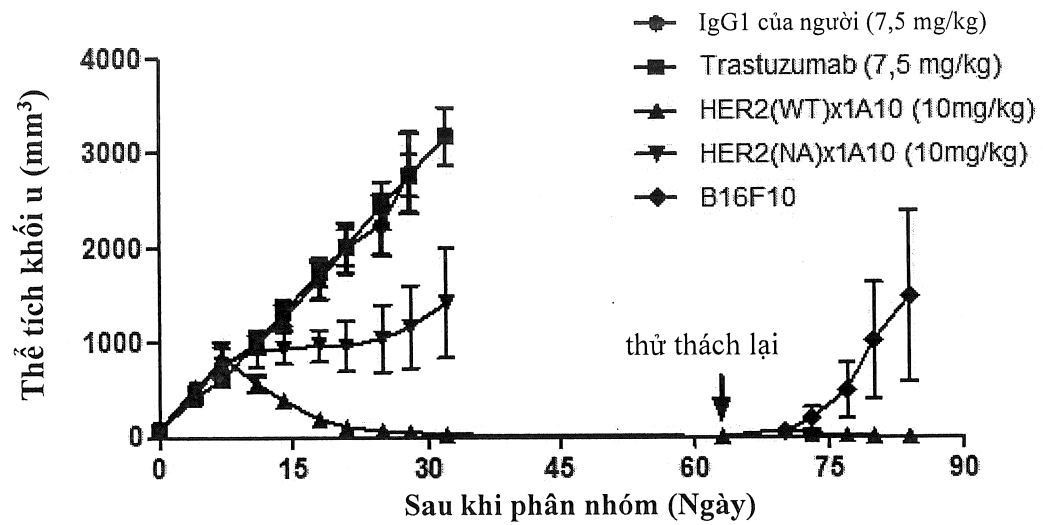


Fig. 14

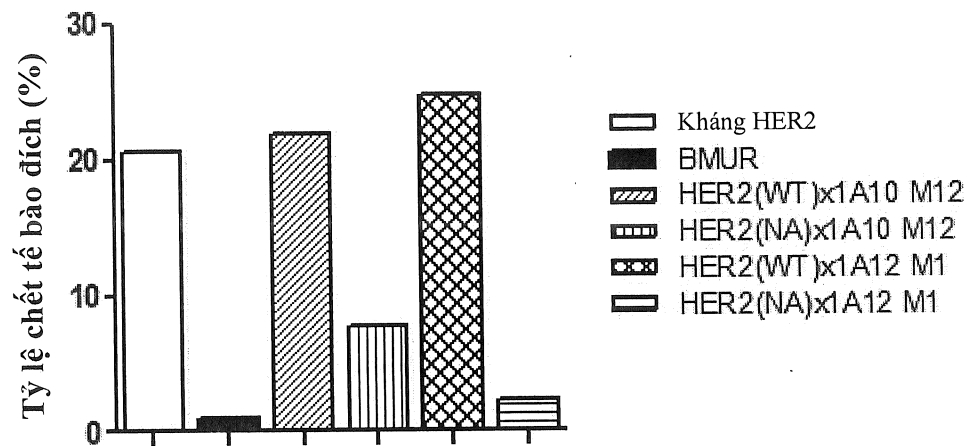


Fig. 15a

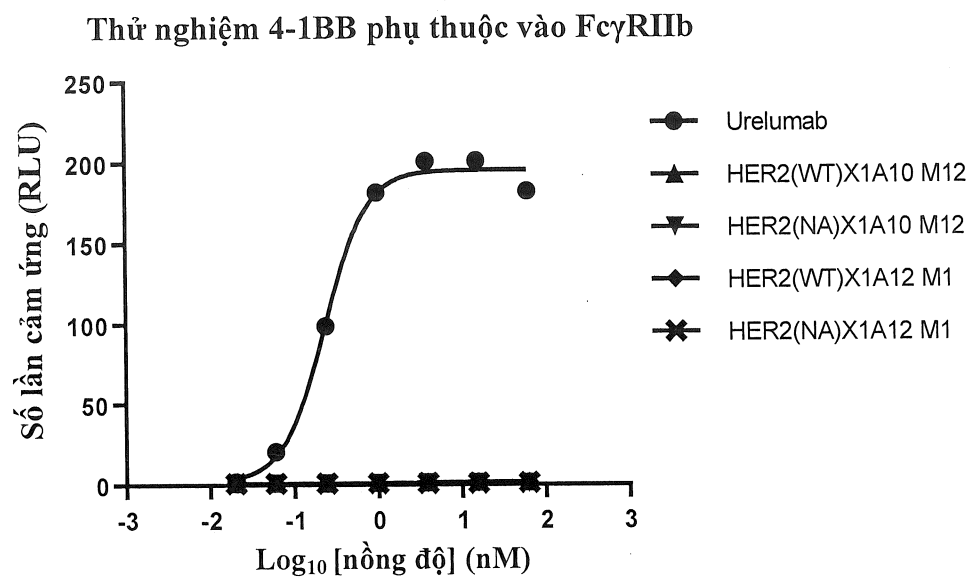
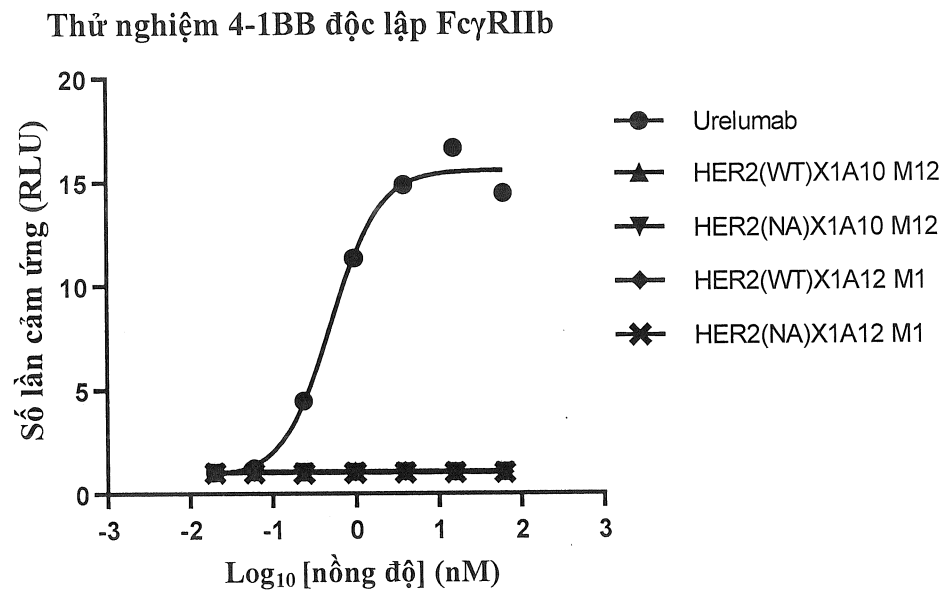


Fig. 15b



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ABL Bio Inc.
 YUHAN CORPORATION

<120> KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG 4-1BB/KHÁNG HER2 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
 KHÁNG THỂ NÀY

<130> OPP20202723KR

<150> 62/878,951
 <151> 2019-07-26

<150> 63/024,608
 <151> 2020-05-14

<160> 89

<170> koPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-CDR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 1
 Ser Tyr Asp Met Ser
 1 5

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-CDR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 2
 Gly Tyr Asp Met Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H-CDR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 3
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> H-CDR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 4
Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> H-CDR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 5
Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> H-CDR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 6
Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> H-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 7
 Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> H-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 8
 Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> H-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 9
 Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> H-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 10
 His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Gly

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

<220>
 <223> H-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 11
 Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-CDR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 12
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-CDR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 13
 Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 14
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 14
 Ala Asp Ser His Arg Pro Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 15
 Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 16
 Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val
 1 5 10

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 17
 Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10)

<400> 18
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10 M4, 1A10 M12)

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10 M11, 1A10 M13)

 <400> 20
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A12)

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A12M1)

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

<210> 23
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB (AB41)

<400> 23
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
(1A10 đột biến)

<400> 24

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
(1A10 M4, 1A10 M12 đột biến)

<400> 25

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10 M11, 1A10 M13 đột biến)

<400> 26

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
(1A12 đột biến)

<400> 27

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
(1A12M1 đột biến)

<400> 28

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

```

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

```

```

<210>      29
<211>      119
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
            (AB41 đột biến)

```

```

<400>      29
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys Pro Gly Ala
      1              5              10              15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile
      35              40              45
Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
      50              55              60
Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
      65              70              75              80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95

```

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10, 1A10 M4, 1A10 M11, 1A12)

<400> 30
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 31
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10 M12, 1A10 M13, 1A12M1)

<400> 31
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
(AB41)

<400> 32

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 33

<211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10, 1A10 M4, 1A10 M11, 1A12 đột biến)

<400> 33
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 34
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
 (1A10 M12, 1A10 M13, 1A12M1 đột biến)

<400> 34
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H-FR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 35

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

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

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H-FR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H-FR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 37
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-FR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 38
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-FR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 39
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-FR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 40
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-FR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 41
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-FR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 42
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

<210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-FR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 43
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H-FR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 44

Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H-FR4 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 46

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> L-FR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 46

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> L-FR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 47
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 48
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-FR1 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-FR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 49
 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-FR2 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 50
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-FR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 51
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-FR3 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 52
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-FR4 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 53
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 54
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> L-FR4 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

 <400> 54
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> L-FR4 tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

 <400> 55
 Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

 <210> 56
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

 <400> 56
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

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

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

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

<210> 57

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 57

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

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

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

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 58
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

 <400> 58
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

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

<210> 59
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 59
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 130 135 140
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 325 330 335
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 60
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 60
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr		
	100	105
Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
	115	120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser		
	130	135
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
	165	170
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
	180	185
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr		
	195	200
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg		
	210	215
Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
	225	230
Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	245	250
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	260	265
Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
	275	280
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
	290	295
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
	305	310
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		

325 330 335
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 61
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 61
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

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

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

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

<210> 62

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 62

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

35

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

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
210 215

<210> 64

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB

<400> 64

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp 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

<400> 67

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR1 tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 68
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR2 tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 69
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L-CDR3 tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 70
 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 72
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 72
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 73
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 73
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

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

<210> 74
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể kháng HER2 (N297A)

<400> 74

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

260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 75
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng HER2

<400> 75
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

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

<210> 76

<211> 716

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể đặc hiệu kép (HER2(NA)x1A10)

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 450 455 460
 Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly
 465 470 475 480
 Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn
 485 490 495
 Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 500 505 510
 Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 515 520 525
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 530 535 540
 Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser
 545 550 555 560
 Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 565 570 575
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 580 585 590
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 595 600 605

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
610 615 620

Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
625 630 635 640

Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala
645 650 655

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
660 665 670

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
675 680 685

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp
690 695 700

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
705 710 715

<210> 77

<211> 719

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể đặc hiệu kép (HER2 (NA)x1A10
GSLH)

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg
690 695 700

Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
705 710 715

<210> 78

<211> 719

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể đặc hiệu kép (HER2 (NA)x1A10 M4)

<400> 78

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly
 465 470 475 480

Thr Pro Gly Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn
 485 490 495
 Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
 500 505 510
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro
 515 520 525
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
 530 535 540
 Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp
 545 550 555 560
 Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr
 565 570 575
 Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 580 585 590
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 595 600 605
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 610 615 620
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 625 630 635 640
 Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile
 645 650 655
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 660 665 670
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 675 680 685
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg
 690 695 700
 Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 705 710 715

<210> 79
 <211> 719
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể đặc hiệu kép (HER2 (NA)x1A10 M12)

```

<400>      79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
      20              25              30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn
 485 490 495
 Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
 500 505 510
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro
 515 520 525
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
 530 535 540
 Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp
 545 550 555 560

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

355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	420	425
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440
Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
450	455	460
Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly		
465	470	475
Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn		
	485	490
Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu		
	500	505
Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe		
	515	520
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu		
530	535	540
Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser		
545	550	555
Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	565	570
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	580	585
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
	595	600
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
	610	615
Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu		
625	630	635
Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala		

645 650 655
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 660 665 670
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val
 675 680 685
 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser
 690 695 700
 Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 705 710 715 720
 Ser Ser

 <210> 81
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể đặc hiệu kép (HER2 (NA)x1A12
 GSLH)

 <400> 81
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

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

420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser		
450	455	460
Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly		
465	470	475
Thr Pro Gly Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn		
	485	490
Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala		
	500	505
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro		
	515	520
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile		
	530	535
Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp		
	545	550
Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr		
	565	570
Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	580	585
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly		
	595	600
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly		
	610	615
Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
	625	630
Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr		
	645	650
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn		
	660	665
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
	675	680
Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr		
	690	695
Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
		700

61

195					200					205						
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
210					215					220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
245					250					255						
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
260					265					270						
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
275					280					285						
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	
290					295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
325					330					335						
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
340					345					350						
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
355					360					365						
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
370					375					380						
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
385					390					395					400	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
405					410					415						
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
420					425					430						
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
435					440					445						
Gly	Lys	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	
450					455					460						
Gly	Ser	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	
465					470					475					480	
Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	


```

                485                490                495
Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
      500                505                510
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro
      515                520                525
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
      530                535                540
Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp
545                550                555                560
Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr
      565                570                575
Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
      580                585                590
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
595                600                605
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
610                615                620
Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
625                630                635                640
Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr
      645                650                655
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
      660                665                670
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
      675                680                685
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr
690                695                700
Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu
705                710                715                720
Val Thr Val Ser Ser
      725

```

```

<210>      83
<211>      719
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>

```

<223> Chuỗi nặng tổng hợp của kháng thể đặc hiệu kép (HER2 (WT)x1A10 M12)

<400> 83

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
      20           25           30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

```

260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	355	360
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	370	375
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	420	425
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440
Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser		
	450	455
Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly		
465	470	475
Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn		
	485	490
Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala		
	500	505
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro		
	515	520
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile		
	530	535
Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp		
		540

66

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn
 485 490 495
 Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
 500 505 510
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro
 515 520 525
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
 530 535 540
 Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp
 545 550 555 560
 Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr
 565 570 575
 Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 580 585 590
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 595 600 605
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 610 615 620
 Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 625 630 635 640

Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr
645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
660 665 670

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr
690 695 700

Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu
705 710 715 720

Val Thr Val Ser Ser
725

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thành phần liên kết peptit tổng hợp

<400> 85
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 86
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thành phần liên kết peptit tổng hợp

<400> 86
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 87
<211> 20
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Thành phần liên kết peptit tổng hợp

<400> 87

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> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ tổng hợp của kháng thể kháng 4-1BB
(AB41 đột biến)

<400> 88

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 89

<211> 255

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4-1BB của người tổng hợp (NP_001552.2)


```

<400>      89
Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
  1              5              10              15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
      20              25              30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
      35              40              45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
      50              55              60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
      65              70              75              80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
      85              90              95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
      100              105              110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
      115              120              125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
      130              135              140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
      145              150              155              160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
      165              170              175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
      180              185              190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
      195              200              205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
      210              215              220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
      225              230              235              240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
      245              250              255

```