



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

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

(11)



1-0051453

C07K 16/28; A61K 47/64; A61K 47/68; (13) B

(51)^{2020.01} A61P 35/00; C12P 21/08; C12N 1/19;
C12N 1/21; C12N 15/13; C12N 15/63;
C12N 5/10; A61K 39/395; C12N 1/15

(21) 1-2021-01172

(22) 09/08/2019

(86) PCT/JP2019/031554 09/08/2019

(87) WO2020/032230 13/02/2020

(30) 2018-152126 10/08/2018 JP

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/05/2021 398A

(73) Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha (JP)

5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543, Japan

(72) IGAWA, Tomoyuki (JP); SAKURAI, Mika (JP); SHIMIZU, Shun (JP); HORI, Yuji (JP); HIRONIWA, Naoka (JP); SAVORY, Nasa (JP); NARITA, Yoshinori (JP); KAMIKAWA, Takayuki (JP); MIYAZAKI, Taro (JP); KADONO, Shojiro (JP); HASEGAWA, Masami (JP); TATSUMI, Kanako (JP); HAYASAKA, Akira (JP); KAWAI, Takeaki (JP); MIMOTO, Futa (JP); KAWAUCHI, Hiroki (JP); KAMIMURA, Masaki (JP).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD137, AXIT NUCLEIC PHÂN LẬP, VECTƠ, TẾ BÀO CHỦ, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ KHÁNG CD137

(21) 1-2021-01172

(57) Mục đích của sáng chế là đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có tác dụng hoạt hóa tế bào miễn dịch, hoạt tính gây độc tế bào, hoặc hoạt tính kháng u, và trong khi đó có tác dụng giảm trên mô không phải khối u chẳng hạn như các mô bình thường và ít tạo ra các tác dụng phụ, và phương pháp sử dụng chúng.

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có tác dụng hoạt hóa tế bào miễn dịch, hoạt tính gây độc tế bào, hoặc hoạt tính kháng u, và trong khi đó có tác dụng giảm trên các mô không phải khối u chẳng hạn như các mô bình thường và ít tạo ra các tác dụng phụ, được đề xuất bằng cách phát hiện và tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên CD137 có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào nhiều chất nền khác nhau (ví dụ, các hợp chất phân tử nhỏ) trong mô đích. Các phương pháp sử dụng phân tử này, được phẩm, và tương tự như vậy cũng được đề xuất.

Sáng chế còn đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết với kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, phương pháp điều chế, và sử dụng phân tử này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 và phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư là căn bệnh gây chết người mà khó để chữa trị hoàn toàn trừ một số trường hợp. Kết quả điều trị bằng các chất trị liệu hóa học, mà là phương pháp trị liệu chủ yếu, không có nghĩa là tốt. Có ý kiến cho rằng không chỉ tính không đồng nhất của chính các tế bào ung thư mà môi trường vi mô khối u cũng đóng vai trò quan trọng như yếu tố gây khó khăn trong việc điều trị ung thư (NPL 1). Gần đây, ung thư hắc tố ác tính không thể cắt bỏ và điều này đã được chứng minh là có khả năng điều trị bằng kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể này ngăn chặn chức năng ức chế miễn dịch của CTLA-4 và từ đó tăng cường sự hoạt hóa của các tế bào T (NPL 2). Năm 2011, kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4 của người (ipilimumab) đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê chuẩn là thuốc kháng thể kích hoạt miễn dịch đầu tiên trên thế giới. Ngoài ra, các kháng thể ức chế kháng lại PD-1 và PD-L1, các phân tử điểm kiểm tra miễn dịch khác không phải CTLA-4, cũng đã được báo cáo là có hiệu quả trị liệu (NPL 3), và được phê chuẩn bởi FDA.

Các tế bào T được hiểu rằng đóng vai trò quan trọng trong sự miễn dịch khối u, được hoạt hóa bằng hai tín hiệu: 1) khả năng liên kết của thụ thể tế bào T (TCR) với peptit kháng nguyên được trình diện bởi các phân tử phức hợp tương thích mô chính (MHC) lớp I và sự hoạt hóa của TCR; và 2) khả năng liên kết của phân tử đồng kích thích trên bề mặt của các tế bào T với phối tử của nó trên các tế bào trình diện kháng nguyên và sự hoạt hóa của phân tử đồng kích thích. Ngoài ra, sự hoạt hóa của sự phân tử đồng kích thích thuộc về liên họ thụ thể yếu tố hoại tử mô (TNFRSF), bao gồm CD137 (4-1BB), trên bề mặt của các tế bào T đã được mô tả là có vai trò quan trọng đối với sự hoạt hóa tế bào T (NPL 4).

TNFRSF bao gồm CD137, CD40, OX40, RANK, GITR, và các phân tử như vậy. CD137 được biểu hiện theo như báo cáo không chỉ trên bề mặt của các tế bào

T mà còn trên bề mặt của các tế bào miễn dịch khác chẳng hạn như tế bào tua (DC), tế bào B, tế bào NK, đại thực bào, và bạch cầu trung tính (NPL 5).

Kháng thể chủ vận CD137 đã được chứng minh là thể hiện tác dụng kháng u ở mẫu chuột, và điều này đã được chứng minh chủ yếu là do sự hoạt hóa của tế bào NK và tế bào T dương tính với CD8 bằng các thử nghiệm trên mẫu chuột (NPL 6). Tuy nhiên, tác dụng phụ do ngộ độc gan không đặc hiệu của kháng thể chủ vận CD137 đã trở thành các vấn đề lâm sàng và phi lâm sàng, cản trở tiến trình phát triển của thuốc mong muốn (NPL 7, NPL 8). Được cho rằng các tác dụng phụ chủ yếu gây ra bởi sự hoạt hóa của các tế bào miễn dịch ở các mô không phải u, không miễn dịch chẳng hạn như gan liên quan đến khả năng liên kết của kháng thể với thụ thể Fc γ thông qua vùng hằng định kháng thể (NPL 9). Mặt khác, đã có báo cáo rằng để các kháng thể thành viên liên họ thụ thể kháng TNF chủ vận thể hiện hoạt tính chủ vận *in vivo*, kháng thể cần được liên kết chéo bởi các tế bào biểu hiện thụ thể Fc γ (các tế bào biểu hiện Fc γ RII) (NPL 10). Nghĩa là, khả năng liên kết của kháng thể chủ vận CD137 với thụ thể Fc γ có liên quan đến cả hiệu quả của thuốc đối với tác dụng kháng u của kháng thể và tác dụng phụ của nó chẳng hạn như gây ngộ độc gan. Do đó, việc tăng khả năng liên kết giữa kháng thể và thụ thể Fc γ được kỳ vọng là làm tăng cường hiệu quả của thuốc nhưng cũng có thể làm tăng tác dụng phụ gây độc cho gan, và việc giảm khả năng liên kết giữa kháng thể và thụ thể Fc γ có thể làm giảm tác dụng phụ mà còn làm giảm hiệu quả của thuốc. Cho đến nay chưa có báo cáo nào về kháng thể chủ vận CD137 mà có hiệu quả của thuốc và tác dụng phụ được tách biệt. Hơn nữa, tác dụng kháng u của bản thân kháng thể chủ vận CD137 không có ý nghĩa hiệu quả về mặt lâm sàng, và cần phải tăng cường thêm hiệu quả của thuốc cùng với việc tránh khỏi độc tính. Theo đó, mong muốn phát triển một thuốc mới mà có khả năng gây ra các đáp ứng miễn dịch kháng u trong khi nó cũng làm giảm tác dụng phụ.

Khi sử dụng kháng thể trị liệu được cho cơ thể sống, điều mong muốn là kháng nguyên đích của nó chỉ được biểu hiện đặc hiệu tại vị trí thương tổn. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, cùng một kháng nguyên cũng được biểu hiện ở các vị trí không có thương tổn, tức là các mô bình thường, và điều này có thể là nguyên nhân gây ra các tác dụng phụ không mong muốn từ quan điểm của việc điều trị. Ví dụ, trong khi các kháng thể kháng lại các kháng nguyên khối u có thể thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các tế bào khối u bởi ADCC v.v., chúng cũng có thể gây

tổn thương cho các tế bào bình thường nếu cùng một kháng nguyên được biểu hiện ở các tế bào bình thường. Để giải quyết các vấn đề nêu trên, cần tập trung vào hiện tượng trong đó các hợp chất nhất định hiện diện nhiều trong các mô đích (ví dụ mô khối u), và kỹ thuật tìm kiếm các phân tử liên kết kháng nguyên với hoạt tính liên kết kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào nồng độ của các hợp chất này được phát triển (ví dụ, PTL 1).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[PTL 1] WO2013/180200

Tài liệu không phải patent

[NPL 1] Hanahan, Cell, 2011, 144, 646-74

[NPL 2] Prieto, Clin Cancer Res. 2012, 18, 2039-47

[NPL 3] Hamid, Expert Opin. Biol. Ther., 2013, 6, 847-61

[NPL 4] Summers, Nat Rev Immunol, 2012, 12, 339-51

[NPL 5] Vinay, Cellular & Molecular Immunology, 2011, 8, 281-284

[NPL 6] Houot, Blood, 2009, 114, 3431-8

[NPL 7] Ascierto, Semin Oncol, 2010, 37, 508-16

[NPL 8] Dubrot, Cancer Immunol Immunother, 2010, 59, 1223-33

[NPL 9] Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22

[NPL 10] Li, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110(48), 19501-6

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 và phương pháp sử dụng chúng.

Giải quyết vấn đề

Để cung cấp phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có tác dụng hoạt hóa tế bào miễn dịch, hoạt tính gây độc tế bào, hoặc hoạt tính kháng u và trong khi đó có tác dụng giảm trên mô không phải khối u chẳng hạn như các mô bình thường

và có ít tác dụng phụ, và cung cấp phương pháp sử dụng chúng, sáng chế đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đặc trưng ở chỗ trong đó hoạt tính liên kết của chúng với CD137 thay đổi tùy thuộc vào các hợp chất khác nhau (ví dụ các hợp chất phân tử nhỏ) trong mô đích (ví dụ mô khối u), và đề xuất phương pháp sử dụng chúng, dược phẩm, và tương tự. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có tác dụng phụ thấp, và do đó liều có thể được tăng lên mà không lo ngại về tác dụng phụ, và kết quả là, chúng có thể biểu hiện hiệu quả của thuốc mạnh hơn (hoạt tính gây độc tế bào hoặc hoạt tính kháng u).

Đặc biệt, sáng chế đề xuất các phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, phương pháp sử dụng chúng, dược phẩm, và tương tự, được lấy làm ví dụ như được mô tả dưới đây.

[1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

[2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [1], trong đó hoạt tính liên kết với CD137 khi có mặt 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính liên kết với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[2.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [1] hoặc [2], trong đó hoạt tính liên kết với CD137 khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính liên kết với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[2.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.1], trong đó giá trị KD đối với CD137 khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là 5×10^{-7} M trở xuống.

[2.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.2], trong đó giá trị KD đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ là 1×10^{-6} M hoặc cao hơn.

[2.4]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [1], trong đó giá trị KD đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ là 10 μ M trở lên là 5×10^{-7} M trở xuống, và giá trị KD đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được bổ sung vào là 1×10^{-6} M hoặc cao hơn.

[2.5]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [1], trong đó giá trị KD đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ là 10 μ M trở lên, và giá trị KD đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào, mỗi giá trị được đo bằng thử nghiệm Biacore trong 24 giờ sau khi CD137 và phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được tiếp xúc với nhau trong dung dịch.

[2.6]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.5], trong đó phân tử này tạo ra phức hợp ba phần tử với hợp chất phân tử nhỏ và CD137.

[2.7]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.6], trong đó phân tử này liên kết với CD137 có nguồn gốc từ người và khỉ.

[2.8]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.7], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là hợp chất chứa adenosin.

[2.9]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.8], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [2.9], trong đó phân tử này bao gồm tổ hợp bất kỳ của HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 được chọn từ (a) đến (k) dưới đây:

- (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;
- (b) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;
- (c) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17;
- (d) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18;
- (e) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18;
- (f) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18;
- (g) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18;
- (h) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19;
- (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20;
- (j) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20;
và
- (k) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17.

[3.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó phân tử này bao gồm tổ hợp bất kỳ của HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 được chọn từ (a) đến (g) dưới đây:

- (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;
- (b) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;
- (c) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 28;
- (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 29;
- (e) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 23, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;
- (f) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;
- và
- (g) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

[4]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm tổ hợp bất kỳ của HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 được chọn từ (a) đến (m) dưới đây:

- (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;
- (b) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(j) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20,

HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(k) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(l) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27; và

(m) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

[5]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa:

(a) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43 đến 53; hoặc

(b) VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54 đến 60.

[5.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, trong đó phân tử này bao gồm tổ hợp bất kỳ của VH và VL được chọn từ (a) đến (m) dưới đây:

(a) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;

(b) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 44, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 55;

- (c) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 45, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 55;
- (d) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 46, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;
- (e) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 47, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;
- (f) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 48, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56;
- (g) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 49, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 57;
- (h) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 50, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 58;
- (i) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59;
- (j) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60;
- (k) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 52, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60;
- (l) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 50, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59; và

(m) VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 53, và VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54.

[5.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, trong đó phân tử này bao gồm tổ hợp bất kỳ của VH và VL được chọn từ (a) đến (m) dưới đây:

- (a) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;
- (b) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 44, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 55;
- (c) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 45, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 55;
- (d) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 46, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;
- (e) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 47, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;
- (f) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 48, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56;
- (g) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 49, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 57;
- (h) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 50, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 58;
- (i) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59;
- (j) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60;
- (k) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 52, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60;

(l) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 50, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59; và

(m) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 53, và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54.

[5.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có giá trị [hoạt tính liên kết (lượng liên kết) với CD137 khi có mặt 10 μ M trở lên hợp chất phân tử nhỏ]/[hoạt tính liên kết (lượng liên kết) với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ] là bằng hoặc lớn hơn giá trị của phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm tổ hợp của HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

[5.4]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.3], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm tổ hợp của VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54.

[5.5]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có giá trị [hoạt tính liên kết (KD) với CD137 khi có mặt 1 μ M hợp chất phân tử nhỏ]/[hoạt tính liên kết (KD) với CD137 khi có mặt 10 μ M trở lên hợp chất phân tử nhỏ] là bằng hoặc lớn hơn giá trị của phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu,

trong đó phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm tổ hợp của HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

[5.6]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.5], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm tổ hợp của VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54.

[5.7]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 này cạnh tranh với phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [3] đến [5.2] để liên kết với CD137 khi có mặt 10 μM trở lên, 50 μM trở lên, 100 μM trở lên, 150 μM trở lên, 200 μM trở lên, hoặc 250 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ.

[5.8]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 liên kết với cùng một epitop của CD137 được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [3] đến [5.2] khi có mặt 10 μM trở lên, 50 μM trở lên, 100 μM trở lên, 150 μM trở lên, 200 μM trở lên, hoặc 250 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ.

[5.8A]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.3] đến [5.8], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là hợp chất chứa adenosin.

[5.8B]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.3] đến [5.8A], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[5.9]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5.8B], trong đó phân tử này là kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó.

[5.10]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5.9], trong đó phân tử này là kháng thể người, kháng thể được làm tương thích với người, hoặc kháng thể khảm, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó.

[5.11]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5.10], trong đó phân tử này là kháng thể IgG1 có độ dài đầy đủ.

[5.12]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5.11], trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc được biến đổi trong đó ít nhất một axit amin được biến đổi, trong đó vùng Fc được biến đổi này có hoạt tính liên kết với FcγRIIb tăng so với vùng Fc gốc mà không chứa sự biến đổi axit amin.

[5.13]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.12], trong đó hoạt tính liên kết của Fc được biến đổi với FcγRIIb là bằng hoặc cao hơn hoạt tính của vùng Fc tham chiếu, trong đó Fc tham chiếu này là vùng Fc IgG1 của người chứa tổ hợp của đột biến thể axit amin G236N/H268D/A330K theo cách đánh số EU.

[5.14]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.12] hoặc [5.13], trong đó vùng Fc tham chiếu này chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 153.

[5.15]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.12], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là ít nhất một đột biến thể axit amin được chọn từ nhóm bao gồm G236N, H268D, và A330K theo cách đánh số EU.

[5.16]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.12] hoặc [5.15], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là tổ hợp của các đột biến thể axit amin G236N/H268D/A330K theo cách đánh số EU.

[5.17]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.12] đến [5.16], trong đó vùng Fc gốc có nguồn gốc từ vùng Fc IgG1 của người.

[5.18]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5.17], trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc được biến đổi trong đó ít nhất một axit amin được biến đổi, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có điểm đẳng điện (pI) tăng so với điểm đẳng điện của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 gốc chứa vùng Fc gốc mà không bao gồm sự biến đổi axit amin.

[5.19]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.18], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là sự biến đổi của gốc axit amin có thể được bộc lộ trên bề mặt của vùng Fc gốc.

[5.20]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.18] hoặc [5.19], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là:

- (i) sự thay thế ít nhất một gốc axit amin có điện tích âm trên chuỗi bên trong vùng Fc gốc bằng gốc axit amin không mang điện trên chuỗi bên,
- (ii) sự thay thế ít nhất một gốc axit amin không mang điện trên chuỗi bên trong vùng Fc gốc bằng gốc axit amin có điện tích dương trên chuỗi bên, và/hoặc
- (iii) sự thay thế ít nhất một gốc axit amin có điện tích âm trên chuỗi bên trong vùng Fc gốc bằng gốc axit amin có điện tích dương trên chuỗi bên.

[5.21]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.18] đến [5.20], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là tổ hợp của các đột biến thể axit amin, và trong đó đột biến thể axit amin này được đặt ở các vị trí có hình dạng gần giống nhau.

[5.22]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.18] đến [5.21], trong đó hoạt tính liên kết của vùng Fc được biến đổi này với thụ thể Fcγ (FcγR) không bị giảm một cách đáng kể so với hoạt tính liên kết của vùng Fc gốc.

[5.23]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [5.22], trong đó thụ thể Fcγ (FcγR) này là FcγRIIb.

[5.24]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.18] đến [5.23], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là ít nhất một đột biến thể axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Q311R, P343R, và D413K theo cách đánh số EU.

[5.25]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [5.18] đến [5.24], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là (i) đột biến thể axit amin P343R, (ii) tổ hợp của các đột biến thể axit amin Q311R/P343R, hoặc (iii) tổ hợp của các đột biến thể axit amin Q311R/D413K, theo cách đánh số EU.

[6]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5.25], trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc được biến đổi, trong đó vùng Fc được biến đổi này bao gồm tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin được chọn từ nhóm sau đây:

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K;

L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K;

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K;

L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K;

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R;

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R;
 L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R;
 L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R;
 L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R;
 L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
 K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
 L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K;
 K214R/G236N/H268D/A330K/P343R;
 K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R;
 K214R/G236N/H268D/A330K/D413K;
 K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
 K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
 K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R;
 K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R;
 K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
 K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
 K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K;
 K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K; và
 K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R,

theo cách đánh số EU.

[6.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó vùng Fc được biến đổi này có nguồn gốc từ vùng Fc IgG1 của người.

[6.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6.1], trong đó vùng Fc được biến đổi này còn bao gồm các đột biến mất đoạn tại vị trí 446 và 447 theo cách đánh số EU.

[7]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6.2], trong đó phân tử này bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 64 đến 85.

[7.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm tổ hợp bất kỳ của VH, VL, CH, và CL được chọn từ (i) đến (xxxviii) dưới đây:

(i) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 64, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(ii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 66, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(iii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 67, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(iv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 68, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(v) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 69, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(vi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 70, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(vii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 71, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(viii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 73, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(ix) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(x) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 78, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 80, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 82, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xiii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 84, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xiv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 85, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 65, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xvi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 72, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xvii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 74, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xviii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xix) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 77, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xx) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 78, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 79, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 80, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxiii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 81, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxiv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 82, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 83, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxvi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 84, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxvii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 72, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxviii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 74, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxix) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxx) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 77, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 78, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 79, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxiii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 80, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxiv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 81, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxv) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 82, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxvi) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 83, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63;

(xxxvii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 84, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63; và

(xxxviii) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 51, CH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 85, VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60, và CL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63.

[8]

Axit nucleic phân lập mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1].

[9]

Vector chứa axit nucleic theo mục [8].

[10]

Tế bào chủ chứa axit nucleic theo mục [8] hoặc vector theo mục [9].

[11]

Phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo mục [10] sao cho phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được sản xuất.

[12]

Thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1] và chất gây độc tế bào.

[13]

Dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1] hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12]; và chất mang dược dụng.

[14]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1] hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], để sử dụng làm dược phẩm.

[14.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], hoặc được phẩm theo mục [13], để sử dụng trong điều trị khối u.

[14.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc được phẩm theo mục [14.1], trong đó khối u này là khối u rắn xâm nhiễm bởi tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, và/hoặc tế bào T dương tính với CD8.

[14.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc được phẩm theo mục [14.1], trong đó khối u này là khối u rắn xâm nhiễm bởi tế bào T điều hòa (Treg).

[15]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], hoặc được phẩm theo mục [13], để sử dụng trong quá trình hoạt hóa tế bào miễn dịch.

[15.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc được phẩm theo mục [15], trong đó tế bào miễn dịch này là tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, và/hoặc tế bào T.

[15.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], hoặc được phẩm theo mục [13], để hoạt hóa tế bào miễn dịch trong mô khối u.

[15.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 hoặc được phẩm theo mục [15.2], trong đó tế bào miễn dịch này là tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, và/hoặc tế bào T.

[15.4]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], hoặc được phẩm theo mục [13], để sử dụng trong việc làm tổn thương tế bào.

[16]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], hoặc được phẩm theo mục [13], có mức độ hoạt hóa miễn dịch trong mô không phải khối u là thấp hơn mức độ hoạt hóa miễn dịch của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 mà không có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

[16.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc được phẩm theo mục [16], trong đó mô không phải khối u này là hạch bạch huyết, lá lách, và/hoặc gan.

[16.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1] hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], mà không liên kết một cách đáng kể với CD137 được biểu hiện trong mô không phải khối u.

[16.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1] hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], mà có thời gian bán thải trong máu dài hơn thời gian bán thải trong máu của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

[17]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], thể tiếp hợp miễn dịch theo mục [12], hoặc được phẩm theo mục [13], mà có mức độ tác dụng phụ thấp hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

[17.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc được phẩm theo mục [17], trong đó tác dụng phụ này là tăng AST, tăng ALT, sốt, buồn nôn, viêm gan cấp tính, bệnh gan, phì đại lách, viêm ruột non, viêm da có mụn, giảm bạch cầu trung tính, giảm lympho bào, giảm tiểu cầu, biểu hiện của transaminaza, và/hoặc tăng bilirubin huyết.

[18]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

[18.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[18.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18] hoặc [18.1], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[18.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18] hoặc [18.1], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 50 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[18.4]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18] hoặc [18.1], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 250 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[18.5]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [18] đến [18.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi tế bào biểu hiện CD137.

[18.6]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18.5], trong đó tế bào biểu hiện CD137 là tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập hoặc tế bào T có nguồn gốc từ PBMC của người.

[18.7]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [18] đến [18.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị.

[18.8]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18], trong đó phân tử này bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ cuối cùng của hợp chất phân tử nhỏ là 50 μ M trở lên, và không bộc lộ một cách đáng kể hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào.

[18.9]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18.8], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ cuối cùng của hợp chất phân tử nhỏ là 50 μ M trở lên, và hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào, mỗi hoạt tính được đánh giá bằng lượng IL-2, IFN- γ , và/hoặc IL-6 được đo trong 72 giờ sau khi tế bào biểu hiện CD137 và phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được tiếp xúc với nhau trong dung dịch.

[18.10]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [18.8], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ cuối cùng của hợp chất phân tử nhỏ là 50 μ M trở lên, và hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào, mỗi hoạt tính được đánh giá bằng tín hiệu phát quang luciferaza được đo trong 6 giờ sau khi

tế bào T biểu hiện cấu trúc chỉ thị NF-kappaB-luciferaza và CD137 được tiếp xúc với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

[18.11]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [18] đến [18.10], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là hợp chất chứa adenosin.

[18.12]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [18] đến [18.11], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[19]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7.1], trong đó phân tử này có hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

[19.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[19.2]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19] hoặc [19.1], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[19.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19] hoặc [19.1], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 50 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[19.4]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19] hoặc [19.1], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 250 μ M trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[19.5]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [19] đến [19.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi tế bào biểu hiện CD137.

[19.6]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19.5], trong đó tế bào biểu hiện CD137 là tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập hoặc tế bào T có nguồn gốc từ PBMC của người.

[19.7]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [19] đến [19.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị.

[19.8]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19], trong đó phân tử này bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ cuối cùng của hợp chất phân tử nhỏ là 50 μ M trở lên, và không bộc lộ một cách đáng kể hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào.

[19.9]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19.8], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ cuối cùng của hợp chất phân tử nhỏ là 50 μ M trở lên, và hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào, mỗi hoạt tính được đánh giá bằng lượng IL-2, IFN- γ , và/hoặc IL-6 được đo trong 72 giờ sau khi tế bào biểu hiện CD137 và phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được tiếp xúc với nhau trong dung dịch.

[19.10]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục [19.8], trong đó hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch được điều chế sao cho nồng độ cuối cùng của hợp chất phân tử nhỏ là 50 μM trở lên, và hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ không được thêm vào, mỗi hoạt tính được đánh giá bằng tín hiệu phát quang luciferaza được đo trong 6 giờ sau khi tế bào T biểu hiện cấu trúc chỉ thị NF-kappaB-luciferaza và CD137 được tiếp xúc với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

[19.11]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [19] đến [19.10], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là hợp chất chứa adenosin.

[19.12]

Phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo mục bất kỳ trong số các mục từ [19] đến [19.11], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[20]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc được biến đổi, trong đó vùng Fc được biến đổi này bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin dẫn tới điểm đẳng điện (pI) tăng so với điểm đẳng điện của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc chứa vùng Fc gốc, và trong đó phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận này có hoạt tính chủ vận tăng so với hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc.

[20.1]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục [20], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là sự biến đổi của gốc axit amin có thể được bộc lộ trên bề mặt của vùng Fc gốc.

[20.2]

Kháng thể liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục [20] hoặc [20.1], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là:

(i) sự thay thế ít nhất một gốc axit amin có điện tích âm trên chuỗi bên trong vùng Fc gốc bằng gốc axit amin không mang điện trên chuỗi bên,

(iii) sự thay thế ít nhất một gốc axit amin không mang điện trên chuỗi bên trong vùng Fc gốc bằng gốc axit amin có điện tích dương trên chuỗi bên, và/hoặc

(iii) sự thay thế ít nhất một gốc axit amin có điện tích âm trên chuỗi bên trong vùng Fc gốc bằng gốc axit amin có điện tích dương trên chuỗi bên.

[20.3]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [20.2], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là tổ hợp của các đột biến thể axit amin, và trong đó các đột biến thể axit amin này được đặt ở các vị trí có hình dạng gần giống nhau.

[20.4]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [20.3], trong đó hoạt tính liên kết của vùng Fc được biến đổi với thụ thể Fcγ không bị giảm một cách đáng kể so với hoạt tính liên kết của vùng Fc gốc.

[20.5]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục [20.4], trong đó thụ thể Fcγ này là FcγRIIb.

[20.6]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [20.4], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là ít nhất một đột biến thể axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Q311R, P343R, và D413K, theo cách đánh số EU.

[20.7]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [20.6], trong đó ít nhất một biến đổi axit amin là sự biến đổi axit amin của (i) P343R/D413K, (ii) Q311R/P343R, (iii) P343R, (iv) D413K, (v) Q311R, hoặc (vi) Q311R/D413K hoặc tổ hợp của chúng, theo cách đánh số EU.

[20.8]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [20.7], trong đó phân tử này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

[20.9]

Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [20.8], trong đó phân tử này là kháng thể kháng CD137.

[21]

Phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc được biến đổi, trong đó phương pháp này bao gồm:

bước đưa vào Fc gốc ít nhất một biến đổi axit amin dẫn tới điểm đẳng điện (pI) tăng so với điểm đẳng điện của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc chứa vùng Fc gốc,

trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận này chứa vùng Fc được biến đổi được tăng so với hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc.

[21.1]

Phương pháp theo mục [21], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[21.2]

Phương pháp theo mục [21] hoặc [21.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[21.3]

Phương pháp theo mục [21] hoặc [21.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 50 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[21.4]

Phương pháp theo mục [21] hoặc [21.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 250 μ M trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[21.5]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [21.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi tế bào biểu hiện kháng nguyên.

[21.6]

Phương pháp theo mục [21.5], trong đó tế bào biểu hiện kháng nguyên này là tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập hoặc tế bào T có nguồn gốc từ PBMC của người.

[21.7]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [21.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị.

[21.8]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [21.7], còn bao gồm:

- (i) thu vector biểu hiện bao gồm trình tự khởi đầu thích hợp có thể được liên kết theo cách hoạt động được bằng gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận tạo ra bởi phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [21.7],
- (ii) đưa vector vào tế bào chủ và nuôi cấy tế bào chủ để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận, và
- (iii) thu thập phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ.

[21.9]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [21.8], trong đó phân tử này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

[21.10]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21] đến [21.9], trong đó phân tử này là kháng thể kháng CD137.

[21.11]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21.1] đến [21.10], trong đó hợp chất phân tử nhỏ là hợp chất chứa adenosin.

[21.12]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [21.1] đến [21.11], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[22]

Phương pháp làm tăng hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc, trong đó phương pháp này bao gồm việc đưa vào vùng Fc ít nhất một biến đổi axit amin dẫn tới điểm đẳng điện (pI) tăng so với điểm đẳng điện của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc chứa vùng Fc gốc.

[22.1]

Phương pháp theo mục [22], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[22.2]

Phương pháp theo mục [22] hoặc [22.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[22.3]

Phương pháp theo mục [22] hoặc [22.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 50 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[22.4]

Phương pháp [22] hoặc [22.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 250 μ M trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[22.5]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22] đến [22.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi tế bào biểu hiện kháng nguyên.

[22.6]

Phương pháp theo mục [22.5], trong đó tế bào biểu hiện kháng nguyên này là tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập hoặc tế bào T có nguồn gốc từ PBMC của người.

[22.7]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22] đến [22.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị.

[22.8]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22] đến [22.7], trong đó phân tử này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

[22.9]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22] đến [22.8], trong đó phân tử này là kháng thể kháng CD137.

[22.10]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22.1] đến [22.9], trong đó hợp chất phân tử nhỏ là hợp chất chứa adenosin.

[21.11]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22.1] đến [22.10], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[23]

Phương pháp sử dụng ít nhất một biến đổi axit amin để làm tăng hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc, trong đó sự biến đổi axit amin dẫn tới điểm đẳng điện (pI) tăng so với điểm đẳng điện của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc chứa vùng Fc gốc.

[23.1]

Phương pháp theo mục [23], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[23.2]

Phương pháp theo mục [23] hoặc [23.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[23.3]

Phương pháp theo mục [23] hoặc [23.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 50 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[23.4]

Phương pháp theo mục [23] hoặc [23.1], trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 250 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

[23.5]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23] đến [23.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi tế bào biểu hiện kháng nguyên.

[23.6]

Phương pháp theo mục [23.5], trong đó tế bào biểu hiện kháng nguyên này là tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập hoặc tế bào T có nguồn gốc từ PBMC của người.

[23.7]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23] đến [23.4], trong đó hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị.

[23.8]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23] đến [23.7], trong đó phân tử này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

[23.9]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23] đến [23.8], trong đó phân tử này là kháng thể kháng CD137.

[23.10]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23.1] đến [23.9], trong đó hợp chất phân tử nhỏ là hợp chất chứa adenosin.

[23.11]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23.1] đến [23.10], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[24]

Phương pháp sàng lọc miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên hoặc thụ viện của các miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với phân tử dung hợp khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ, trong đó trong phân tử dung hợp, hai hoặc nhiều đơn vị của kháng nguyên được dung hợp với một đơn vị của đối tác dung hợp,

(b) đặt miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên trong phân tử dung hợp trong bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ thấp, và

(c) phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b).

[24.1]

Phương pháp theo mục [24], trong đó phân tử đối tác dung hợp này là vùng Fc dime.

[24.2]

Phương pháp theo mục [24.1], trong đó vùng Fc bao gồm tiểu đơn vị Fc thứ nhất và tiểu đơn vị Fc thứ hai, và trong đó một đơn vị của kháng nguyên được dung hợp với mỗi trong số tiểu đơn vị Fc thứ nhất và thứ hai.

[24.3]

Phương pháp theo mục [24.1] hoặc [24.2], trong đó một đơn vị của kháng nguyên được dung hợp với tận cùng N của mỗi trong số tiểu đơn vị Fc thứ nhất và thứ hai.

[24.4]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [24] đến [24.3], trong đó thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này là thư viện thể thực khuẩn.

[24.5]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [24] đến [24.4], trong đó các thể thực khuẩn được bao gồm trong thư viện thể thực khuẩn là các thể thực khuẩn trình diện trên bề mặt của hai hoặc nhiều miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên của chúng.

[24.6]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [24] đến [24.5], trong đó các thể thực khuẩn được bao gồm trong thư viện thể thực khuẩn là các thể thực khuẩn có khiếm khuyết trong gen pIII có nguồn gốc từ thể thực khuẩn phụ.

[25]

Phương pháp sàng lọc miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hai hoặc nhiều hợp chất phân tử nhỏ khác nhau, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên hoặc thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ thứ nhất,

(b) đặt miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ thứ nhất ở nồng độ thấp, và

(c) phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b),

(d) cho miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập trong bước (c) tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ thứ hai,

(e) đặt miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (d) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ thứ hai ở nồng độ thấp, và

(f) phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (e),

trong đó

phương pháp này không bao gồm, giữa các bước (c) và (d), khuếch đại gen mã hóa miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập trong bước (c).

[25.1]

Phương pháp [25], trong đó thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên là thư viện thể thực khuẩn.

[26]

Phương pháp sàng lọc miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chưa qua xử lý tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ,
- (b) đặt miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ thấp, và
- (c) phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b),

trong đó thư viện chưa qua xử lý này là thư viện thể thực khuẩn bao gồm các thể thực khuẩn trình diện trên bề mặt hai hoặc nhiều miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên của chúng.

[27]

Phương pháp sàng lọc miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc các phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ,
- (b) đặt miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ thấp, và
- (c) phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b),

trong đó thư viện này là thư viện bao gồm các thể thực khuẩn có khiếm khuyết trong gen pIII có nguồn gốc từ thể thực khuẩn phụ.

[28]

Phương pháp sàng lọc miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc các phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ,

(b) đặt miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ thấp, và

(c) phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b),

trong đó thư viện này là thư viện bao gồm các thể thực khuẩn được chuẩn bị bằng cách làm tăng biểu hiện của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên với chất phụ gia phân tử nhỏ mà làm tăng mức độ biểu hiện từ trình tự khởi đầu điều hòa biểu hiện của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên.

[28.1]

Phương pháp sàng lọc theo mục [28], trong đó chất phụ gia phân tử nhỏ này là isopropyl- β -thiogalactopyranosit hoặc arabinosa.

[28.2]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [24] đến [28.1], trong đó hợp chất phân tử nhỏ là hợp chất chứa adenosin.

[28.3]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [24] đến [28.2], trong đó hợp chất phân tử nhỏ này là ATP.

[29] Phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô khối u, trong đó hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt 100 μ M hợp chất này là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất.

[29.1] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [29], trong đó giá trị KD khi có mặt 100 μ M hợp chất này là 5×10^{-7} M trở xuống.

[29.2] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [29] hoặc [29.1], trong đó giá trị KD khi không có hợp chất này là 1×10^{-6} M hoặc cao hơn.

[29.3] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.2], trong đó phân tử này có hoạt tính trung hòa kháng lại kháng nguyên.

[29.4] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.3], trong đó phân tử này có hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào biểu hiện kháng nguyên.

[29.5] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.4], trong đó kháng nguyên này là kháng nguyên được biểu hiện hoặc được tiết ra bởi tế bào bất kỳ trong số tế bào khối u, tế bào miễn dịch, và tế bào đệm trong mô khối u.

[29.6] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.5], trong đó hợp chất này là hợp chất chứa adenosin.

[29.7] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.6], trong đó phân tử này chứa vùng Fc.

[29.8] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [29.7], trong đó vùng Fc này là vùng Fc đột biến chứa sự biến đổi axit amin, trong đó vùng Fc đột biến này đã tăng cường hoạt tính liên kết với ít nhất một thụ thể Fcγ được chọn từ nhóm bao gồm FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, và FcγRIIIa, so với vùng Fc kiểu hoang.

[29.9] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.8], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể hoặc đoạn kháng thể.

[30] Dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.9] và chất mang dược dụng.

[30.1] Dược phẩm theo mục [30], trong đó dược phẩm này để sử dụng trong điều trị khối u.

[30.2] Dược phẩm theo mục [30.1], trong đó dược phẩm này có hoạt tính gây độc tế bào trong mô không phải khối u thấp hơn dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng.

[30.3] Dược phẩm theo mục [30.1] hoặc [30.2], trong đó dược phẩm này có mức độ tác dụng phụ thấp hơn dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng.

[30.4] Dược phẩm theo mục [30.2] hoặc [30.3], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng này là phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô khối u.

[31] Phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên để sử dụng trong điều trị khối u, trong đó phương pháp này bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt 100 μM hợp chất đặc hiệu mô khối u là cao hơn gấp hai lần trở lên so với hoạt tính liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất.

[32] Phương pháp sản xuất dược phẩm để sử dụng trong điều trị khối u, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [29] đến [29.9] với chất mang dược dụng.

[33] Phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất đặc hiệu mô đích, trong đó hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt 1 μM hợp chất này là thấp hơn hai lần trở xuống so với hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt lượng đủ hợp chất này.

[33.1] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [33], trong đó giá trị KD khi có mặt 1 μM hợp chất này là 2×10^{-7} M hoặc cao hơn.

[33.2] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [33] hoặc [33.1], trong đó giá trị KD khi có mặt lượng đủ hợp chất này là 1×10^{-7} M trở xuống.

[33.3] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [33] đến [33.2], trong đó hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô khối u.

[33.4] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [33.3], trong đó hợp chất này là hợp chất chứa adenosin.

[33.5] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [33] đến [33.4], có độ lưu lại trong huyết tương cao hơn và/hoặc có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp hơn phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng.

[33.6] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục [33.5], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng là phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô đích.

[33.7] Phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [33] đến [33.6], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể hoặc đoạn kháng thể.

[34] Dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [33] đến [33.7] và chất mang dược dụng.

[35] Phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có đặc tính duy trì trong huyết tương cao hơn và/hoặc khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp hơn phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (a) tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất đặc hiệu mô đích tăng, và (b) đo đặc tính duy trì trong huyết tương và/hoặc khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên được tạo ra ở bước (a).

[35.1] Phương pháp theo mục [35], trong đó phương pháp này bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt 1 μ M hợp chất đặc hiệu mô đích là thấp hơn hai lần trở xuống so với hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt lượng đủ hợp chất này.

[35.2] Phương pháp theo mục [35] hoặc [35.1], trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng này là phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô đích.

[36] Phương pháp sản xuất dược phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [33] đến [33.7] với chất mang dược dụng.

[37] Phương pháp đo nồng độ ATP trong dung dịch, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (i) cho tế bào Luc/HEK293 phân chia biểu hiện P2Y11 tiếp xúc với dung dịch, và (ii) đo hoạt tính luciferaza trong tế bào.

[37.1] Phương pháp theo mục [37], trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho dung dịch chứa chất nền luciferaza tiếp xúc với tế bào.

[37.2] Phương pháp theo mục [37] hoặc [37.1], trong đó dung dịch này là dịch gian bào trong mô *in vivo*.

[37.3] Phương pháp theo mục [37.2], trong đó mô này là mô khối u.

[37.4] Phương pháp theo mục [37.2] hoặc [37.3], trong đó bước (i) là bước cấy tế bào Luc/HEK293 phân chia biểu hiện P2Y11 vào mô *in vivo*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 khác nhau được thử nghiệm sử dụng các tế bào Jurkat khi có mặt hoặc không có mặt ATP.

Trục X thể hiện nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$) và trục Y thể hiện đơn vị sáng tương đối.

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 khác nhau được thử nghiệm sử dụng các tế bào Jurkat khi có mặt hoặc không có mặt ADP.

Trục X thể hiện nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$) và trục Y thể hiện đơn vị sáng tương đối.

Fig. 3 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 khác nhau được thử nghiệm sử dụng các tế bào T của người khi có mặt hoặc không có mặt ADPbetaS.

Fig. 4 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của dBBAT119-P253/dBBAT119L-LamLib (kháng thể kháng CD137 chuyển phân tử nhỏ) hoặc NS1-P253 (kháng thể kháng CD137 không chuyển) được thử nghiệm sử dụng các tế bào T của người khi có mặt hoặc không có mặt ADPbetaS.

Trục X thể hiện nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$) và trục Y thể hiện lượng sản sinh IFN- γ (ng/mL).

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP của các kháng thể kháng CD137 khác nhau (kháng thể kháng CD137 chuyển với hoạt tính liên kết được cải thiện) được thử nghiệm bằng ELISA thể thực khuẩn.

Trục Y thể hiện tỷ lệ hấp thụ S/N khi có mặt/không có mặt ATP, và trục X thể hiện tỷ lệ S/N khi có mặt/không có mặt kháng nguyên.

Fig. 6 là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết của các biến thể của khác nhau của kháng thể kháng CD137 (dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib) với CD137 của người khi có mặt hoặc không có mặt ATP.

Hàng trên thể hiện hoạt tính liên kết với CD137 của người khi không có ATP và hàng dưới thể hiện hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt ATP.

Fig. 7 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib, dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 (đối chứng), hoặc NS1-P253 (kháng thể kháng CD137 không chuyển) được thử nghiệm sử dụng các tế bào T của người khi có mặt hoặc không có mặt ADPbetaS.

Hình (A) thể hiện các kết quả thử nghiệm khi không có ADPbetaS và Hình (B) thể hiện các kết quả thử nghiệm khi có mặt ADPbetaS.

Trục X thể hiện nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$) và trục Y thể hiện lượng sản sinh IFN- γ (ng/mL).

Fig. 8 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau được thử nghiệm sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị 4-1BB Jurkat khi có mặt hoặc không có mặt ATP.

Hình (A) thể hiện các kết quả thử nghiệm khi không có ATP và Hình (B) thể hiện các kết quả thử nghiệm khi có mặt ATP.

Fig. 9 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ , được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 10 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ hoặc tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 11 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ , được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 12 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ , được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 13 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ , được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 14 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ , được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 15 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng hoạt

tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể $Fc\gamma$, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 16 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 17 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 18 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 19 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 20 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 21 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 22 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng, được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 23 là biểu đồ thể hiện sự tăng cường hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau khi có mặt hoặc không có mặt ATP do tăng hoạt tính liên kết của các vùng hằng định chuỗi nặng với các thụ thể Fc γ , được thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người.

Hình (A) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IL-2 làm chỉ số, và Hình (B) thể hiện hoạt tính chủ vận được xác định bằng cách sử dụng lượng sản sinh IFN- γ làm chỉ số.

Fig. 24 là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết tương của các kháng thể kháng CD137 chuyển và không chuyển khác nhau được thử nghiệm sử dụng chuột knock-in CD137 của người.

Các Fc đều là mIgG1.

Fig. 25 là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết tương của các kháng thể kháng CD137 chuyển và không chuyển khác nhau được thử nghiệm sử dụng chuột knock-in CD137 của người.

Các Fc đều là MB110.

Fig. 26 là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết tương của các kháng thể kháng CD137 chuyển và không chuyển khác nhau được thử nghiệm sử dụng chuột knock-in CD137 của người.

Các Fc đều là MB492.

Fig. 27 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A375-mIgG1/B167-ml0r ở mẫu chuột được cấy bằng các tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 28 là biểu đồ thể hiện khối lượng các cơ quan ở mẫu chuột được cấy bằng các tế bào MC38 sau khi sử dụng các kháng thể (NO1-mIgG1 hoặc A375-mIgG1/B167-ml0r).

Hình (A) thể hiện khối lượng hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng lá lách.

Fig. 29 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong hạch bạch huyết của các mẫu chuột được cấy bằng các tế bào MC38 sau khi sử dụng NO1-mIgG1 hoặc A375-mIgG1/B167-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với ICOS trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (C) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 30 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong lá lách của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NO1-mIgG1 hoặc A375-mIgG1/B167-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với ICOS trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (C) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 31 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NO1-mIgG1 hoặc A375-mIgG1/B167-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 32 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A356-MB110/B040-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 33 là biểu đồ thể hiện khối lượng các cơ quan ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS2-MB110 hoặc A356-MB110/B040-ml0r.

Hình (A) thể hiện khối lượng hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng lá lách.

Fig. 34 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS2-MB110 hoặc A356-MB110/B040-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với ICOS trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 35 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A372-mIgG1/B040-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 36 thể hiện số lượng các tế bào hạch bạch huyết (Hình (A)) và khối lượng lá lách (Hình (B)) ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng A372-mIgG1/B040-ml0r.

Fig. 37 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng A372-mIgG1/B040-ml0r (tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8).

Fig. 38 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A372-MB110/B040-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 39 là biểu đồ thể hiện khối lượng các cơ quan ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS2-MB110 hoặc A372-MB110/B040-ml0r.

Hình (A) thể hiện khối lượng hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng lá lách.

Fig. 40 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS2-MB110 hoặc A372-MB110/B040-ml0r (tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8).

Fig. 41 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A372-MB492/B040-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 42 là biểu đồ thể hiện số lượng các tế bào hạch bạch huyết và khối lượng cơ quan của lá lách ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-MB492 hoặc A372-MB492/B040-ml0r.

Hình (A) thể hiện số lượng các tế bào hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng cơ quan của lá lách.

Fig. 43 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-MB492 hoặc A372-MB492/B040-ml0r (tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8).

Fig. 44 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A486-MB492/B167-ml0r hoặc A488-MB492/B226-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 45 là biểu đồ thể hiện số lượng tế bào trên mỗi hạch bạch huyết và khối lượng lá lách ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r, hoặc A488-MB492/B226-ml0r.

Hình (A) thể hiện số lượng tế bào trên mỗi hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng của lá lách.

Fig. 46 là biểu đồ thể hiện mức độ thâm nhiễm của các tế bào hiệu ứng trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r, hoặc A488-MB492/B226-ml0r (tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với CD8 và dương tính với CD3 trong các tế bào T dương tính với CD45).

Fig. 47 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A489-MB492/B223-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 48 là biểu đồ thể hiện số lượng các tế bào hạch bạch huyết và số lượng tế bào trong phần lympho bào của lá lách ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-MB492 hoặc A489-MB492/B223-ml0r.

Hình (A) thể hiện số lượng các tế bào hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện số lượng tế bào trong phần lympho bào của lá lách.

Fig. 49 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-MB492 hoặc A489-MB492/B223-ml0r (tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với CD8 trong các tế bào T dương tính với CD45).

Fig. 50 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Hình (A) thể hiện tác dụng kháng u của A548-mIgG1/B256-ml0r và Hình (B) thể hiện tác dụng kháng u của A551-mIgG1/B256-ml0r.

Fig. 51 là biểu đồ thể hiện khối lượng các cơ quan ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-mIgG1, A548-mIgG1/B256-ml0r, hoặc A551-mIgG1/B256-ml0r.

Hình (A) thể hiện khối lượng hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng lá lách.

Fig. 52 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-mIgG1, A548-mIgG1/B256-ml0r, hoặc A551-mIgG1/B256-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 53 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của A551-MB110/B379-ml0r ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38.

Fig. 54 là biểu đồ thể hiện khối lượng các cơ quan ở mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-mIgG1 hoặc A551-MB110/B379-ml0r.

Hình (A) thể hiện khối lượng hạch bạch huyết và Hình (B) thể hiện khối lượng lá lách.

Fig. 55 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong lá lách của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-mIgG1 hoặc A551-MB110/B379-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với ICOS trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (C) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 56 là biểu đồ thể hiện mức độ hoạt hóa tế bào T trong gan của các mẫu chuột được cấy dòng tế bào MC38 sau khi sử dụng NS1-mIgG1 hoặc A551-MB110/B379-ml0r.

Hình (A) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với PD-1 trong các tế bào T dương tính với CD8, Hình (B) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với ICOS trong các tế bào T dương tính với CD8, và Hình (C) thể hiện

tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với Granzym B trong các tế bào T dương tính với CD8.

Fig. 57 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 khác nhau được thử nghiệm sử dụng các tế bào Jurkat khi có mặt hoặc không có mặt L-kynurenin.

Trục X thể hiện nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$) và trục Y thể hiện đơn vị sáng tương đối.

Fig. 58 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 khác nhau được thử nghiệm sử dụng các tế bào 4-1BB Jurkat khi có mặt hoặc không có hợp chất phân tử nhỏ (ATP hoặc ADP).

Trục X thể hiện nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$) và trục Y thể hiện đơn vị sáng tương đối.

Fig. 59 là biểu đồ thể hiện độ đáp ứng ATP (sự phát quang luciferin phụ thuộc nồng độ ATP) của các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 được tạo ra để xác định mức độ ATP ngoại bào.

Fig. 60 là biểu đồ thể hiện độ đáp ứng ATP *in vivo* (sự phát quang luciferin phụ thuộc nồng độ ATP) của các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 khi được cấy dưới da cho chuột.

Fig. 61 là biểu đồ thể hiện các kết quả hình ảnh phát quang của chuột được cấy dưới da các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 và các nồng độ ATP được xác định trước, và hình ảnh phát quang của chuột mang khối u FM3A được cấy dưới da các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11. Các dấu ở phần bụng của chuột thể hiện sự phát quang được phát hiện.

Fig. 62 là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết phụ thuộc nồng độ ATP (giá trị KD) của kháng thể kháng hIL6R MRAH-G4T1/MRAL-k0 (kháng thể đối chứng), và H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1 (tất cả đều là kháng thể chuyên) kháng lại hIL6R.

Fig. 63 là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết phụ thuộc nồng độ ADP (giá trị KD) của kháng thể kháng hIL6R MRAH-G4T1/MRAL-k0 (kháng thể đối chứng), và H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1 (tất cả đều là kháng thể chuyên) kháng lại hIL6R.

Fig. 64 là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết phụ thuộc nồng độ AMP (giá trị KD) của kháng thể kháng hIL6R MRAH-G4T1/MRAL-k0 (kháng thể đối chứng), và H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1 (tất cả đều là kháng thể chuyển) kháng lại hIL6R.

Fig. 65 là biểu đồ thể hiện hoạt tính ADCC phụ thuộc nồng độ ATP của kháng thể kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 (tất cả đều là kháng thể chuyển).

Fig. 66 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng u *in vivo* của kháng thể kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 (tất cả đều là kháng thể chuyển). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 là kháng thể đối chứng âm.

Fig. 67 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của kháng thể kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), ở chuột bình thường và ở chuột chuyển gen hIL6R. Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của kháng thể.

Fig. 68 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của kháng thể kháng hIL6R H0002-mFa55/L1058-ml0 (kháng thể chuyển), ở chuột bình thường và ở chuột chuyển gen hIL6R. Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của kháng thể.

Fig. 69 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của kháng thể kháng hIL6R H0041-mFa55/L1088-ml0 (kháng thể chuyển), ở chuột bình thường và ở chuột chuyển gen hIL6R. Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của kháng thể.

Fig. 70 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của kháng thể kháng hIL6R H0052-mFa55/L1083-ml0 (kháng thể chuyển), ở chuột bình thường và ở chuột chuyển gen hIL6R. Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của kháng thể.

Fig. 71 là biểu đồ thể hiện sự tích tụ kháng nguyên ở chuột chuyển gen hIL6R sau khi sử dụng mỗi kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và kháng thể chuyển kháng hIL6R

H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 (tất cả đều là kháng thể chuyển). Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của hIL6R hòa tan. IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (được chú thích là KLH-mFa55 trong hình) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm.

Fig. 72 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng u *in vivo* của kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và kháng thể chuyển kháng hIL6R H0002-mFa55/L1058-ml0 và H0041-mFa55/L1088-ml0 (cả hai đều là kháng thể chuyển). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 là kháng thể đối chứng âm.

Fig. 73 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và kháng thể chuyển kháng hIL6R H0002-mFa55/L1058-ml0 và H0041-mFa55/L1088-ml0 (cả hai đều là kháng thể chuyển). Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của kháng thể.

Fig. 74 là biểu đồ thể hiện sự tích tụ kháng nguyên sau khi sử dụng mỗi kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và kháng thể chuyển kháng hIL6R H0002-mFa55/L1058-ml0 và H0041-mFa55/L1088-ml0 (cả hai đều là kháng thể chuyển). Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của hIL6R hòa tan. IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (được chú thích là KLH-mFa55 trong hình) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm.

Fig. 75 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng u *in vivo* của kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng), và kháng thể chuyển kháng hIL6R H0041-mFa55/L1088-ml0 và H0052-mFa55/L1083-ml0 (cả hai đều là kháng thể chuyển). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 là kháng thể đối chứng âm.

Fig. 76 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối chứng) và kháng thể chuyển kháng hIL6R H0052-mFa55/L1083-ml0 (kháng thể chuyển). Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của kháng thể.

Fig. 77 là biểu đồ thể hiện sự tích tụ kháng nguyên sau khi sử dụng mỗi kháng thể không chuyển kháng hIL6R MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (kháng thể đối

chứng) và kháng thể chuyển kháng hIL6R H0052-mFa55/L1083-ml0 (kháng thể chuyển). Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của hIL6R hòa tan. IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (được chú thích là KLH-mFa55 trong hình) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm.

Fig. 78 là biểu đồ thể hiện hoạt tính phụ thuộc nồng độ ATP của các kháng thể kháng PD1 mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (kháng thể đối chứng) và H5029-mFa31/L3021-ml0 (kháng thể chuyển) trong việc ức chế khả năng liên kết của PD-1/PDL-1.

Fig. 79 là biểu đồ thể hiện hoạt tính phụ thuộc nồng độ ATP của các kháng thể kháng PD1 mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (kháng thể đối chứng) và H5041-mFa31/L3021-ml0 (kháng thể chuyển) trong việc ức chế khả năng liên kết của PD-1/PDL-1.

Fig. 80 là biểu đồ thể hiện hoạt tính trung hòa *in vitro* phụ thuộc nồng độ AMP của các kháng thể kháng PD1 mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (kháng thể đối chứng), và H5029-mFa31/L3021-ml0 và H5041-mFa31/L3021-ml0 (cả hai đều là kháng thể chuyển).

Fig. 81 là biểu đồ thể hiện hoạt tính trung hòa *in vitro* phụ thuộc nồng độ ATP của các kháng thể kháng PD1 mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (kháng thể đối chứng), và H5029-mFa31/L3021-ml0 và H5041-mFa31/L3021-ml0 (cả hai đều là kháng thể chuyển).

Fig. 82 là biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng u *in vivo* của các kháng thể kháng PD1 mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 (kháng thể đối chứng) và H5041-mFa55/L3023-ml0 (kháng thể chuyển). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 là kháng thể đối chứng âm.

Fig. 83 là biểu đồ thể hiện hoạt tính của các kháng thể kháng PD1 mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 (kháng thể đối chứng) và H5041-mFa55/L3023-ml0 (kháng thể chuyển) trong việc thải trừ các tế bào biểu hiện PD-1 khỏi (A) khối u và (B) lá lách. Trong hình, “isotyp” chỉ kháng thể đối chứng âm (IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1).

Fig. 84 là biểu đồ thể hiện phương thức liên kết giữa ATP và đoạn Fab của kháng thể chuyển kháng hIL6R H0041L1088. Trong hình, ATP được thể hiện bằng

mô hình bóng và gậy và các gốc axit amin tương tác với ATP được thể hiện bằng mô hình gậy. Đường nét đứt chỉ liên kết hydro giữa kháng thể và ATP.

Fig. 85 là biểu đồ thể hiện trình tự axit amin của miền ngoại bào hIL6R (shIL6R) được lập bản đồ với epitop của kháng thể chuyển kháng hIL6R H0041L1088. Trong hình, các gốc axit amin được tô màu xám là các trình tự axit amin (gốc epitop) của shIL6R chứa một hoặc nhiều nguyên tử không phải hydro được đặt tại khoảng cách 4,2 Angstrom hoặc nhỏ hơn so với ATP hoặc Fab H0041L1088 ở cấu trúc dạng tinh thể.

Fig. 86 là biểu đồ thể hiện chi tiết liên kết giữa shIL6R và đoạn Fab của H0041L1088 được liên kết ATP. Trong hình, chuỗi nặng của kháng thể được mô tả bằng màu đen, chuỗi nhẹ được mô tả bằng màu xám, và shIL6R được mô tả bằng màu trắng. Trong hình, ATP được thể hiện bằng mô hình bóng, và gốc epitop của shIL6R trong 4,2 Angstrom so với kháng thể hoặc ATP và gốc paratop của kháng thể trong 4,2 Angstrom so với gốc epitop được thể hiện bằng mô hình gậy. Đường nét đứt chỉ liên kết hydro giữa kháng thể và shIL6R. Để thể hiện rõ tương tác với ATP, chỉ có F298 của shIL6R được thể hiện bằng mô hình bóng.

Fig. 87 là biểu đồ thể hiện cấu trúc trong đó cấu trúc của Fig. 86 được xoay 180 độ (nhìn từ phía sau).

Fig. 88 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD137 chuyển khác nhau được thử nghiệm sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị 4-1BB Jurkat khi có mặt ATP.

Fig. 89 là biểu đồ thể hiện sự so sánh động lực học huyết tương của mỗi kháng thể chuyển kháng CD137 A375-SCF041aPh/B167-Lamlib và A375-MY201aPh/B167-Lamlib. Trục thẳng đứng của đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của mỗi kháng thể.

Fig. 90 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng u của mỗi A375/B167-SCF041aPh và A375/B167-MY201aPh ở mẫu chuột được chuẩn bị bằng cách cấy dòng tế bào LLC1/OVA/GPC3 vào chuột hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90.

Mỗi dấu chấm thể hiện giá trị trung bình của nhóm (n=5) thể tích khối u.

Fig. 91 là biểu đồ thể hiện hoạt tính chủ vận của các kháng thể kháng CD3 chuyển khác nhau được thử nghiệm bằng thử nghiệm gen chỉ thị sử dụng thử nghiệm sinh học hoạt hóa tế bào T (NFAT) khi có mặt ATP.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Thuật ngữ “hoạt tính liên kết” dùng để chỉ cường độ của tổng số của các tương tác không cộng hóa trị giữa một hoặc nhiều vị trí liên kết của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Ở đây, “hoạt tính liên kết” không bị giới hạn chặt chẽ ở tương tác 1:1 giữa các thành phần của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ví dụ, khi các thành phần của cặp liên kết phản ánh tương tác 1:1 hóa trị một, thì hoạt tính liên kết được gọi một cách cụ thể là ái lực liên kết nội tại (ái lực). Khi một thành viên của cặp liên kết có khả năng liên kết cả đơn hóa trị đa hóa trị, thì hoạt tính liên kết này là tổng của mỗi cường độ liên kết. Hoạt tính liên kết của phân tử X đối với đối tác Y của nó thường có thể được thể hiện bằng hằng số phân ly (KD) hoặc “lượng liên kết của chất phân tích trên mỗi lượng đơn vị phối tử” (dưới đây, có thể được đề cập đến là “lượng liên kết”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, thông thường, giá trị hằng số phân ly (KD) càng thấp thì hoạt tính liên kết càng cao, và giá trị “lượng liên kết của chất phân tích trên mỗi lượng đơn vị phối tử” hoặc “lượng liên kết” càng cao thì hoạt tính liên kết càng cao. Hoạt tính liên kết có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm cả các phương pháp được mô tả ở đây. Các phương án được lấy làm ví dụ và minh họa cụ thể để đo hoạt tính liên kết được mô tả dưới đây.

Kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên “trở thành về hoạt tính liên kết”, hoặc kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên “được tăng (tăng cường) hoạt tính liên kết” dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều biến đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với phân tử liên kết kháng nguyên gốc hoặc kháng thể gốc không mang các biến đổi này, các biến đổi này dẫn đến sự cải thiện hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đối với kháng nguyên.

Các thuật ngữ “phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137” hoặc “kháng thể kháng CD137” và “phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với CD137” hoặc

“kháng thể liên kết với CD137” dùng để chỉ kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với CD137 có hoạt tính liên kết đủ sao cho kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên hữu ích để làm chất điều trị và/hoặc chẩn đoán trong việc nhắm đích CD137. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD137 liên kết với epitop của CD137 mà được bảo toàn trong số CD137 từ các loài khác nhau.

Thuật ngữ phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 hoặc kháng thể kháng CD137 “có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ” nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ cao hơn so với hoạt tính liên kết với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, “sự có mặt của hợp chất phân tử nhỏ” dùng để chỉ điều kiện mà hợp chất phân tử nhỏ có mặt ở nồng độ 10 micromol trở lên, 50 micromol trở lên, 100 micromol trở lên, 150 micromol trở lên, 200 micromol trở lên, hoặc 250 micromol trở lên. Theo một phương án, mức độ hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 với protein không phải CD137, không liên quan khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ là nhỏ hơn khoảng 10% khả năng liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên với CD137 như được đo, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Theo các phương án nhất định, khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hằng số phân ly (KD) là 1 micromol hoặc thấp hơn, 100 nM trở xuống, 10 nM trở xuống, 1 nM trở xuống, 0,1 nM trở xuống, 0,01 nM trở xuống, hoặc 0,001 nM trở xuống (ví dụ, 10^{-6} M trở xuống, 10^{-7} M trở xuống, 10^{-8} M trở xuống, 10^{-9} M trở xuống, 10^{-10} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-6} M đến 10^{-10} M, từ 10^{-7} M đến 10^{-9} M, ví dụ, từ 10^{-7} M đến 10^{-8} M).

Ở đây, thuật ngữ “phân tử liên kết kháng nguyên” được sử dụng theo nghĩa rộng của nó, và dùng để chỉ phân tử liên kết đặc hiệu với yếu tố quyết định kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể, đoạn kháng thể, hoặc dẫn xuất kháng thể.

“Phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận” hoặc “kháng thể chủ vận”, như được sử dụng ở đây, là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên mà gây ra hoặc có thể có hoạt tính sinh học đáng kể của kháng nguyên với phân tử mà nó liên kết (ví dụ, CD137 và CD3).

Do đó, nếu kháng nguyên là, ví dụ, CD137, thì kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này có tác động chủ vận được gọi là “phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận CD137” hoặc “kháng thể chủ vận CD137”, tương ứng. Tương tự, nếu kháng nguyên là, ví dụ, CD3, thì kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này có tác động chủ vận được gọi là “phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận CD3” hoặc “kháng thể chủ vận CD3”, tương ứng.

Thuật ngữ "kháng thể" ở đây được sử dụng với nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ các kháng thể đặc hiệu kép), và các đoạn kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính liên kết-kháng nguyên mong muốn.

“Đoạn kháng thể” dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn mà liên kết kháng nguyên với kháng thể nguyên vẹn này. Ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; các kháng thể kép; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các đoạn kháng thể.

“Phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cùng một epitop” hoặc “kháng thể liên kết với cùng một epitop” là phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu hoặc kháng thể tham chiếu dùng để chỉ kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên phong bế khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu hoặc phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh bằng 50% hoặc cao hơn, và ngược lại, kháng thể tham chiếu phong bế khả năng liên kết của kháng thể với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh bằng 50% hoặc cao hơn. Thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ được đưa ra trong bản mô tả này. Theo một phương án, trong trường hợp phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu hoặc kháng thể tham chiếu thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên theo cách phụ thuộc vào hợp chất có khối lượng phân tử thấp, thử nghiệm cạnh tranh được thực hiện khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp.

Thuật ngữ kháng thể “khảm” dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ một nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi

phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ này thu được từ một nguồn hoặc loài khác.

“Lớp” của kháng thể được dùng để chỉ loại miền hằng định hoặc vùng hằng định của chuỗi nặng của nó. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM và một số lớp trong số này có thể được chia thành phân lớp (các isotyp), ví dụ như, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ và IgA₂. Miền hằng định chuỗi nặng lần lượt tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là alpha, delta, epsilon, gamma, và mu.

“Các chức năng tác động” dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy được cho vùng Fc của kháng thể, hoạt tính này thay đổi theo isotyp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: Liên kết C1q và tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); liên kết thụ thể Fc; tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); sự thực bào; điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và hoạt hóa tế bào B.

“Tác dụng gây độc tế bào” dùng để chỉ tác dụng ức chế hoặc ngăn chặn chức năng tế bào và/hoặc gây ra hiện tượng chết tế bào hoặc phá hủy tế bào. Tác dụng gây độc tế bào có thể là, ví dụ, tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và gây độc tế bào bởi các tế bào T; và có thể là gây độc tế bào do các chất gây độc tế bào (ví dụ, đồng vị phóng xạ và các chất trị liệu hóa học) chẳng hạn như thể tiếp hợp miễn dịch.

Thuật ngữ “vùng Fc” ở đây được sử dụng để định nghĩa vùng tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc của trình tự tự nhiên và các vùng Fc biến đổi. Theo một phương án, vùng Fc của chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến tận cùng carboxyl của chuỗi nặng này. Tuy nhiên, lysin tận cùng C (Lys447) hoặc glyxin-lysin (các gốc 446-447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không. Trừ khi có quy định khác ở đây, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Thuật ngữ “vùng Fc biến đổi” ở đây bao gồm trình tự axit amin mà khác biệt với trình tự axit amin của vùng Fc của trình tự tự nhiên bởi ít nhất một biến đổi axit amin, tốt hơn là một hoặc nhiều (các) đột biến thể axit amin. Tốt hơn là, vùng Fc biến đổi có ít nhất một đột biến thể axit amin so với vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc so với vùng Fc của polypeptit gốc, ví dụ từ khoảng một đến khoảng mười đột biến thể axit amin, và tốt hơn là từ khoảng một đến khoảng năm đột biến thể axit amin trong vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc trong vùng Fc của polypeptit gốc. Tốt hơn là, vùng Fc biến đổi trong bản mô tả này sẽ có độ tương đồng ít nhất khoảng 80% với vùng Fc trình tự tự nhiên và/hoặc với vùng Fc của polypeptit gốc, và tốt nhất là, có độ tương đồng ít nhất khoảng 90% với chúng, càng tốt hơn là, có độ tương đồng ít nhất khoảng 95% với chúng.

Ở đây, các biến đổi hoặc thay thế axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định có thể được biểu hiện bằng tổ hợp của các axit amin và hệ thống đánh số EU. Ví dụ, S424N là viết tắt của đột biến thể ở vị trí 424 theo hệ thống đánh số EU từ serin (Ser) đến asparagin (Asn). EU424N là viết tắt của đột biến thể ở vị trí 424 theo hệ thống đánh số EU từ axit amin (loại bảy kỳ) đến asparagin (Asn).

Thuật ngữ “kháng thể chứa vùng Fc” ở đây dùng để chỉ kháng thể mà chứa vùng Fc. Lysin tận cùng C (gốc 447 theo hệ thống đánh số EU) hoặc glyxin-lysin tận cùng C (các gốc 446-447) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình tinh chế kháng thể hoặc bằng cách thao tác di truyền tái tổ hợp của axit nucleic mã hóa kháng thể. Theo đó, chế phẩm chứa kháng thể có vùng Fc theo sáng chế có thể chứa kháng thể có G446-K447, có G446 và không có K447, đã loại bỏ toàn bộ G446-K447, hoặc hỗn hợp ba loại kháng thể được mô tả ở trên.

Các thuật ngữ “kháng thể có độ dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn”, và “toàn bộ kháng thể” được sử dụng ở đây có thể thay thế lẫn nhau để chỉ kháng thể có cấu trúc gần như tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có các chuỗi nặng chứa vùng Fc hoặc vùng Fc biến đổi như được xác định ở đây.

“Kháng thể người” là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể được sản sinh bởi người hoặc tế bào của người hoặc thu được từ nguồn không phải người mà sử dụng các kho kháng thể người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể người khác. Định nghĩa này về kháng thể người đặc biệt loại trừ

kháng thể được làm tương thích với người chứa các gốc liên kết kháng nguyên không phải của người.

“Khung” hoặc “FR” dùng để chỉ các gốc miền biến đổi mà không phải là các gốc vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

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

“Khung liên ứng của người” là khung mà trình diện các gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong quá trình lựa chọn các trình tự khung VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người. Nói chung, việc chọn lọc các trình tự VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm của các trình tự vùng biến đổi. Nói chung, phân nhóm của các trình tự là phân nhóm như trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như trong Kabat et al., *supra*. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như trong Kabat et al., *supra*.

Kháng thể “được làm tương thích với người” dùng để chỉ kháng thể khả năng chứa các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo một số phương án, kháng thể được làm tương thích với người sẽ chứa gần như tất cả trong số ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các HVR này (ví dụ, CDR) tương ứng với các HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả các FR này

tương ứng với các FR của kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý có thể chứa ít nhất một phần của vùng hằng định kháng thể thu được từ kháng thể người. “Dạng được làm tương thích với người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, dùng để chỉ kháng thể đã trải quá trình làm tương thích với người.

Thuật ngữ “vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” đề cập tới miền chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà có liên quan đến việc liên kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, tương ứng) của kháng thể tự nhiên thường có cấu trúc giống nhau, với mỗi miền chức năng chứa bốn vùng khung (FR) được bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR) (Xem, ví dụ, Kindt et al. *Kuby Immunology*, xuất bản lần thứ 6, W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Một miền VH hoặc VL duy nhất có thể là đủ để tạo ra tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, các kháng thể liên kết với một kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể mà liên kết với kháng nguyên này để sàng lọc thư viện chứa lần lượt các miền VL hoặc VH bổ sung. Xem, ví dụ, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hay “HVR” như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ mỗi vùng trong số các vùng của miền biến đổi của kháng thể mà siêu biến ở trình tự (“vùng quyết định tính bổ trợ” hay “CDR”) và/hoặc tạo các vòng được xác định về mặt cấu trúc (“các vòng siêu biến”) và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên (“các điểm tiếp xúc kháng nguyên”). Thông thường, các kháng thể bao gồm sáu HVR: ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Các HVR minh họa làm ví dụ ở đây bao gồm:

- (a) các vòng siêu biến có ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));
- (b) các CDR xuất hiện ở các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) các dạng tiếp xúc kháng nguyên xuất hiện ở các gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); và

(d) tổ hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, gốc FR) được đánh số ở đây theo Kabat et al., *supra*. Ở đây, các gốc HVR hoặc các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) và các biến đổi hoặc thay thế axit amin ở các gốc này có thể được biểu hiện bằng tổ hợp của các axit amin và hệ thống đánh số Kabat. Ví dụ, N99 là viết tắt của asparagin (Asn) tại vị trí 99 theo cách đánh số Kabat, và N99A là viết tắt của đột biến thế ở vị trí 99 theo cách đánh số Kabat từ asparagin (Asn) đến alanin (Ala).

“Thế tiếp hợp miễn dịch” là kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại, bao gồm nhưng không giới hạn ở chất gây độc tế bào.

Thuật ngữ “chất gây độc tế bào” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn chặn chức năng tế bào và/hoặc gây ra hiện tượng chết tế bào hoặc phá hủy tế bào. Các chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb và các chất đồng vị phóng xạ của Lu); các chất trị liệu hóa học hoặc các thuốc (ví dụ, metotrexat, adriamycin, vinca alkaloid (vincristin, vinblastin, etoposid), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin hoặc các chất xen vào giữa khác); các chất ức chế quá trình tăng trưởng; enzym và các đoạn của chúng chẳng hạn như enzym nucleolytic; kháng sinh; các độc tố chẳng hạn như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố hoạt động theo kiểu enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các đoạn và/hoặc các biến thể của chúng; và các chất kháng khối u hoặc chống ung thư như được mô tả dưới đây.

Kháng thể “được phân lập” là kháng thể mà đã được tách ra khỏi thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Trong một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bởi, ví dụ, phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, hội tụ theo điểm đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Để xem xét các phương

pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, xem, ví dụ, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Axit nucleic “được phân lập” dùng để chỉ phân tử axit nucleic mà đã được tách ra khỏi thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic chứa trong tế bào mà thường chứa phân tử axit nucleic này, nhưng phân tử axit nucleic này xuất hiện ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí trên nhiễm sắc thể mà khác với vị trí trên nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

Thuật ngữ “vector”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân rộng một axit nucleic khác mà nó được liên kết vào. Thuật ngữ này bao gồm vector dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được đưa vào hệ gen của tế bào chủ mà trong đó nó được đưa vào. Một số vector có khả năng điều khiển sự biểu hiện của các axit nucleic mà chúng được liên kết một cách có hiệu quả. Các vector này được gọi ở đây là “vector biểu hiện.”

“Việc mã hóa axit nucleic được mã hóa đối với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137” dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa cho (các) polypeptit tạo thành phân tử liên kết kháng nguyên. “Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng CD137” dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc các đoạn của chúng), bao gồm cả (các) phân tử axit nucleic như vậy ở một vector đơn lẻ hoặc các vector tách biệt, và (các) phân tử axit nucleic như vậy có mặt ở một hoặc nhiều vị trí ở tế bào chủ.

Các thuật ngữ “tế bào chủ”, “dòng tế bào chủ” và “môi trường nuôi cấy tế bào chủ” được sử dụng thay thế lẫn nhau và dùng để chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào trong đó, bao gồm cả thế hệ con của các tế bào này. Các tế bào chủ bao gồm “thể biến nạp” và “các tế bào đã biến nạp”, mà bao gồm tế bào đã biến nạp sơ cấp và thế hệ con thu được từ chúng bất kể số lần cấy. Thế hệ con có thể không đồng nhất hoàn toàn về hàm lượng axit nucleic với tế bào gốc, nhưng có thể chứa các đột biến. Thế hệ con đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học với chức năng hoặc hoạt tính sinh học được sàng lọc hoặc lựa chọn trong tế bào đã được biến nạp ban đầu được bao gồm ở đây.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” như được sử dụng ở đây đề cập tới kháng thể thu được từ tập hợp các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, tức là các kháng thể

riêng biệt này bao gồm tập hợp là đồng nhất và/hoặc liên kết cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến đổi có thể có, ví dụ, chứa các đột biến tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có ở số lượng nhỏ. Trái ngược với các chế phẩm kháng thể đa dòng, chế phẩm này thường bao gồm các kháng thể khác nhau hướng đến các yếu tố quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng hướng đến một yếu tố quyết định riêng trên kháng nguyên. Do đó, bỏ ngữ “đơn dòng” chỉ ra đặc điểm của kháng thể là thu được từ tập hợp kháng thể về cơ bản là đồng nhất, và không được hiểu là đòi hỏi sự sản sinh kháng thể này bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng để sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở phương pháp lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa toàn bộ hoặc một phần của locus globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp minh họa làm ví dụ khác để tạo ra các kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây.

“Kháng thể trần” dùng để chỉ kháng thể mà không được tiếp hợp với một gốc khác loại (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần này có thể có mặt trong dược phẩm.

“Các kháng thể tự nhiên” dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên với các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể IgG tự nhiên là các glycoprotein dạng heterotetrame khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ đồng nhất và hai chuỗi nặng đồng nhất mà được liên kết disulfua. Từ tận cùng N đến tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền chuỗi nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba vùng hằng định (CH1, CH2 và CH3). Tương tự, từ tận cùng N đến tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền chuỗi nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền chuỗi nhẹ hằng định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được xếp vào một trong hai loại, được gọi là kapa (κ) và lamda (λ), dựa trên trình tự axit amin của vùng hằng định của nó.

“Tỷ lệ phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin” so với trình tự polypeptit tham chiếu được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà đồng nhất với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần thiết,

để đạt được tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự tối đa, và không xem các đột biến thể bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp xếp thẳng hàng cho mục đích xác định tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau nằm trong phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính sẵn công khai chẳng hạn như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR), hoặc GENETYX (nhãn hiệu được đăng ký) (Genetyx Co., Ltd.). Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các tham số thích hợp cho việc sắp xếp thẳng hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được sự sắp xếp thẳng hàng tối đa trên toàn bộ độ dài đầy đủ của các trình tự đang được so sánh.

Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được viết bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với hồ sơ người sử dụng tại Văn phòng Bản quyền Mỹ-the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, mà tại đó nó được đăng ký theo Giấy Đăng ký Bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là sẵn có công khai từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các tham số so sánh trình tự được cài đặt bằng chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong các tình huống, trong đó ALIGN-2 được sử dụng cho các so sánh trình tự axit amin, thì % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã cho so với, với hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho (câu này có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho có hoặc chứa % đồng nhất trình tự axit amin nhất định so với, với hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho) được tính như sau:

$$100 \text{ nhân với phân số } X/Y$$

trong đó X là số lượng gốc axit amin được tính điểm là các bắt cặp đồng nhất bởi chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự ALIGN-2 theo sự sắp xếp thẳng hàng A và B của chương trình này, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin trong B. Sẽ được hiểu rõ là khi độ dài trình tự axit amin A không bằng với độ dài của trình tự axit amin B, % đồng nhất trình tự axit amin của A với B sẽ không bằng với % đồng nhất trình tự axit amin của B với A. Trừ khi có quy định khác, tất cả các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng ở đây là thu được như được mô tả trong đoạn ngay tiếp theo bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2 .

Thuật ngữ “dược phẩm” được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng mà cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó trở nên hữu hiệu, và chế phẩm này không chứa các thành phần bổ sung mà gây độc đến mức không thể chấp nhận được cho đối tượng sẽ được sử dụng chế phẩm này.

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

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” của một chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong các khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trị liệu hoặc phòng bệnh mong muốn.

“Cá thể” hoặc “đối tượng” là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các động vật nuôi (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng này là con người.

Thuật ngữ “CD137,” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ CD137 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như linh trưởng (ví dụ, người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm CD137 chưa được xử lý có “chiều dài đầy đủ” cũng như dạng bất kỳ của CD137 thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao hàm các biến thể xuất hiện trong tự nhiên của CD137, ví dụ, các biến thể ghép nối hoặc các biến thể alen.

Trình tự axit amin của CD137 có độ dài đầy đủ được lấy ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 (Trình tự tham chiếu NCBI: NP_001552.2) và trình tự axit amin của vùng ngoại bào CD137 của người được lấy làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 2. Trình tự axit amin của CD137 có độ dài đầy đủ của chuột được lấy ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 (Trình tự tham chiếu NCBI: NP_035742.1) và trình tự axit amin của vùng ngoại bào CD137 của chuột được lấy làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 4. Trình tự axit amin của CD137 có độ dài đầy đủ của khỉ được lấy ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 (Trình tự tham

chiều NCBI: ABY47575.1) và trình tự axit amin của vùng ngoại bào CD137 của khi được lấy làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 6.

CD137 là thành viên của họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u (TNF). Tên thay thế của nó là thành viên 9 liên họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u (TNFRSF9), 4-1BB, và ILA. Ngoài sự biểu hiện của nó trên các tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ được hoạt hóa, CD137 được biểu hiện trong tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) và các tế bào T NK, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, các tế bào T điều hòa CD4⁺ CD25⁺, và các tế bào nội mô mạch máu. Sự biểu hiện trong các tế bào ung thư cũng được báo cáo (Labiano, et al. Oncoimmunology, vol. 24: e1062967 (2015)). Phôi tử CD137 tự nhiên, CD137L, được thể hiện bởi các tế bào trình diện kháng nguyên chẳng hạn như tế bào B, bạch cầu đơn nhân/đại thực bào, và tế bào tua (Watts, et al., Annu. Rev. Immunol., vol. 23: p. 23-68 (2005)). Thông qua sự tương tác của nó với phôi tử, CD137 làm tăng sự tăng sinh tế bào T gây ra bởi TCR, sự sản sinh xytokin, trưởng thành về mặt chức năng, ngăn chặn sự chết rụng tế bào, và sự sống sót lâu dài của các tế bào T CD8⁺ (Nam, et al., Curr. Cancer Drug Targets, vol. 5: p. 357-363 (2005); Watts, et al., Annu. Rev. Immunol., vol. 23: p. 23-68 (2005)).

Các thuật ngữ “caxinom”, “ung thư” và “có ung thư” dùng để chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở động vật có vú mà thường đặc trưng bởi sự sinh trưởng/tăng sinh tế bào không điều hòa được.

Thuật ngữ “khối u” được dùng để chỉ toàn bộ sự phát triển và tăng sinh của tế bào tạo u, dù là lành tính hay ác tính, và tất cả các mô và tế bào tiền ung thư và ung thư. Các thuật ngữ “caxinom”, “ung thư”, “có ung thư”, “rối loạn tăng sinh tế bào”, “rối loạn tăng sinh” và “khối u” không loại trừ lẫn nhau như được đề cập đến trong bản mô tả này.

Các thuật ngữ “rối loạn tăng sinh tế bào” và “rối loạn tăng sinh” được dùng để chỉ các rối loạn mà gắn với một số mức độ tăng sinh tế bào bất bình thường. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào này là bệnh ung thư.

Như được sử dụng ở đây, “việc điều trị” (và các dạng thay đổi về ngữ pháp của nó như “điều trị” hoặc “đang điều trị”) dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm cố gắng thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể đang được điều trị, và có thể được thực hiện để phòng ngừa hoặc trong suốt quá trình mắc bệnh lâm sàng. Các tác

dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa sự phát bệnh hoặc tái phát bệnh, giảm nhẹ các triệu chứng, giảm bớt các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh này, ngăn ngừa hiện tượng di căn, làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và sự thuyên giảm hoặc tiên lượng bệnh được cải thiện. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc để làm chậm sự tiến triển của bệnh.

II. Các chế phẩm và phương pháp (phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137)

Theo một khía cạnh, sáng chế một phần dựa trên phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137 và việc sử dụng chúng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết với CD137. Các kháng thể theo sáng chế có thể bộc lộ tác động hoạt hóa trên các tế bào miễn dịch, tác dụng gây độc tế bào, hoặc hoạt tính kháng u và, do đó, là hữu ích, ví dụ, trong việc chẩn đoán hoặc điều trị ung thư.

A. Kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập liên kết với CD137. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137

- có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ;
- liên kết với vùng ngoại bào của CD137;
- tạo thành phức hợp bậc ba cùng với hợp chất có khối lượng phân tử thấp và CD137;
- liên kết với CD137 có nguồn gốc từ người và CD137 có nguồn gốc từ khỉ;
- là chất chủ vận với hoạt tính CD137;
- thể hiện hoạt tính chủ vận với CD137 khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp;
- có hoạt tính chủ vận thấp với CD137 khi không có hợp chất có khối lượng phân tử thấp; và/hoặc

- không thể hiện hoạt tính chủ vận đáng kể đối với CD137 khi không có hợp chất có khối lượng phân tử thấp.

Hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên

Theo các phương án nhất định, hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên hoặc các kháng thể được đề xuất ở đây là, khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp, với hằng số phân ly (KD) bằng 1 micromol trở xuống, 100 nM trở xuống, 10 nM trở xuống, 1 nM trở xuống, 0,1 nM trở xuống, 0,01 nM trở xuống, hoặc 0,001 nM trở xuống (ví dụ, 10^{-6} M trở xuống, 10^{-7} M trở xuống, 10^{-8} M trở xuống, 10^{-9} M trở xuống, 10^{-10} M trở xuống, ví dụ 10^{-6} M đến 10^{-10} M, 10^{-7} M đến 10^{-9} M, ví dụ 10^{-7} M đến 10^{-8} M).

Theo một phương án, hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được đo bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (RIA) và được biểu diễn bằng KD. Theo một phương án, RIA được thực hiện bằng phiên bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực liên kết dung dịch của Fab đối với kháng nguyên được đo bằng cách cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) khi có mặt chuỗi chuẩn độ của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó bắt giữ kháng nguyên đã liên kết với đĩa phủ kháng thể kháng Fab (xem, ví dụ, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Để thiết lập các điều kiện cho thử nghiệm, các đĩa nhiều giếng MICROTITER (nhãn hiệu đã được đăng ký) (Thermo Scientific) được phủ qua đêm bằng 5 $\mu\text{g/ml}$ kháng thể kháng Fab bắt giữ (Cappel Labs) trong 50 mM natri cacbonat (độ pH=9,6), và phong bế tiếp bằng 2% (khối lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò trong PBS trong hai đến năm giờ ở nhiệt độ phòng (xấp xỉ 23 độ C). Trong đĩa không hấp thụ (Nunc #269620), 100 pM hoặc 26 pM kháng nguyên [^{125}I] được trộn với các dung dịch pha loãng tuần tự của Fab cần quan tâm (ví dụ, phù hợp với đánh giá về kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Fab cần quan tâm sau đó được ủ qua đêm; tuy nhiên, việc ủ có thể được tiếp tục trong một khoảng thời gian dài hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo đạt được sự cân bằng. Sau đó, các hỗn hợp được chuyển sang đĩa bắt giữ để ủ ở nhiệt độ phòng (ví dụ, trong một giờ). Sau đó dung dịch được loại bỏ và đĩa được rửa tám lần bằng 0,1% polysorbate 20 (TWEEN-20 (nhãn hiệu đã được đăng ký)) trong PBS. Khi các đĩa đã khô, 150 microlit/giếng dung dịch lấp lánh

scintillant (MICROSCINT-20™; Packard) được bổ sung vào, và các đĩa được đếm trên máy đếm gamma TOPCOUNT™ (Packard) trong mười phút. Nồng độ của mỗi Fab mà tạo ra nhỏ hơn hoặc bằng 20% sự liên kết tối đa được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm liên kết cạnh tranh.

Theo một phương án, để đo hoạt tính liên kết của kháng thể, các phương pháp bắt giữ phôi tử, ví dụ, bằng cách sử dụng BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200 hoặc BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) 4000 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), dựa vào phương pháp phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt làm nguyên tắc đo, được sử dụng. Phần mềm kiểm soát BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) được sử dụng cho hoạt động của các thiết bị. Theo một phương án, bộ kit ghép cặp amin (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất để cho phép phân tử phân tử bắt giữ phôi tử, ví dụ, kháng thể kháng tag, kháng thể kháng IgG, protein A, v.v. được cố định trên chip cảm biến (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) được phủ bằng carboxymetyldextran. Phân tử bắt giữ phôi tử được pha loãng bằng dung dịch 10 mM natri axetat ở độ pH phù hợp và được tiêm với lưu lượng phù hợp và vào thời điểm tiêm thích hợp. Việc đo hoạt tính liên kết được đo bằng 0,05% polysorbat 20 (tên khác là hệ đệm chứa Tween (nhãn hiệu đã được đăng ký)-20) làm hệ đệm đo, với lưu lượng 10-30 microlit/phút, và ở nhiệt độ đo ưu tiên là 25 độ C hoặc 37 độ C. Đối với quá trình đo được thực hiện bằng kháng thể bị bắt giữ bởi phân tử bắt giữ phôi tử là phôi tử, kháng thể được tiêm để cho phép lượng kháng thể đích bị bắt giữ, và sau đó dung dịch pha loãng tuần tự của kháng nguyên và/hoặc thụ thể Fc (chất phân tích) được điều chế bằng hệ đệm đo được tiêm. Đối với quá trình đo được thực hiện bằng kháng nguyên và/hoặc thụ thể Fc bị bắt giữ bởi phân tử bắt giữ phôi tử làm phôi tử, kháng nguyên và/hoặc thụ thể Fc được tiêm để cho phép lượng đích của nó bị bắt giữ, và sau đó dung dịch pha loãng tuần tự của kháng thể (chất phân tích) được điều chế bằng hệ đệm đo được tiêm.

Theo một phương án, các kết quả đo được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký). Việc tính toán thông số động học được thực hiện bằng cách điều chỉnh đồng thời các đồ thị liên kết và phân ly sử dụng mô hình liên kết 1:1, và tốc độ liên kết (kon hoặc ka), tốc độ phân ly (koff hoặc kd), và hằng số phân ly (KD) cân bằng có thể được tính toán. Đối với trường hợp hoạt tính liên kết yếu, cụ thể là, đối với các trường hợp quá trình phân ly

nhanh và các thông số động học khó tính toán, mô hình trạng thái ổn định có thể được sử dụng để tính toán hằng số phân ly (KD) cân bằng. Đối với các thông số bổ sung liên quan đến hoạt tính liên kết, “lượng liên kết của chất phân tích đối với mỗi lượng phối tử đơn vị” có thể được tính toán bằng cách chia lượng liên kết của chất phân tích (đơn vị cộng hưởng: RU) ở nồng độ cụ thể bằng lượng phối tử bị bắt giữ.

Hoạt tính liên kết phụ thuộc hợp chất phân tử nhỏ

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án không giới hạn, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ cao hơn so với hoạt tính liên kết đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo phương án khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết đối với CD137 khi có mặt nồng độ cao hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn so với hoạt tính liên kết với CD137 khi có mặt nồng độ thấp hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án được ưu tiên, hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 15 lần trở lên, 20 lần trở lên, 25 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 200 lần trở lên, 300 lần trở lên, 500 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 2×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 5×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 2×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 5×10^4 lần trở lên, hoặc 1×10^5 lần trở lên, so với hoạt tính liên kết khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án được ưu tiên khác, hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn 2 lần, cao hơn 3 lần, cao hơn 5 lần, cao hơn 10 lần, cao hơn 15 lần, cao hơn 20 lần, cao hơn 25 lần, cao hơn 30 lần, cao hơn 50 lần, cao hơn 100 lần, cao hơn 200 lần, cao hơn 300 lần, cao hơn 500 lần, cao hơn 1×10^3 lần, cao hơn 2×10^3 lần, cao hơn 3×10^3 lần, cao hơn 5×10^3 lần, cao hơn 1×10^4 lần, cao hơn 2×10^4 lần, cao hơn 3×10^4 lần, cao hơn 5×10^4 lần, hoặc cao hơn 1×10^5 lần, so với hoạt tính liên kết khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ có thể là nồng độ tùy ý bất kỳ miễn là sự khác biệt về hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên

kháng CD137 được phát hiện. Theo một phương án, nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ “khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ” và/hoặc “khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ với nồng độ cao” là, ví dụ, 100 nM trở lên, 500 nM trở lên, 1 μ M trở lên, 3 μ M trở lên, 5 μ M trở lên, 10 μ M trở lên, 50 μ M trở lên, 100 μ M trở lên, 150 μ M trở lên, 200 μ M trở lên, 250 μ M trở lên, 300 μ M trở lên, 400 μ M trở lên, 500 μ M trở lên, hoặc 1 mM trở lên. Theo cách khác, nồng độ có thể được xác định là lượng đủ để kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thể hiện hoạt tính liên kết tối đa. Ngoài ra, theo một phương án, nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ “khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ với nồng độ thấp” có thể là, ví dụ, 500 μ M trở xuống, 250 μ M trở xuống, 200 μ M trở xuống, 150 μ M trở xuống, 100 μ M trở xuống, 50 μ M trở xuống, 10 μ M trở xuống, 1 μ M trở xuống, 500 nM trở xuống, 100 nM trở xuống, 50 nM trở xuống, hoặc 10nM hoặc 1nM trở xuống. Trường hợp mà nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ bằng 0, hoặc nồng độ thực tế bằng không, cũng có thể được chọn là phương án có nồng độ thấp.

Ở đây, thuật ngữ “nồng độ thực tế bằng không” nghĩa là, ví dụ, nồng độ nhỏ đến mức không thể phát hiện được bằng kỹ thuật hiện có mặc dù có mặt hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, hoạt tính liên kết đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M hoặc 250 μ M là 2 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 15 lần trở lên, 16 lần trở lên, 17 lần trở lên, 18 lần trở lên, 19 lần trở lên, hoặc 20 lần trở lên, so với hoạt tính liên kết đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 hoặc kháng thể kháng lại CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở 10 μ M trở lên là, cao hơn 2 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 15 lần trở lên, 16 lần trở lên, 17 lần trở lên, 18 lần trở lên, 19 lần trở lên, hoặc 20 lần trở lên, so với hoạt tính liên kết đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 hoặc kháng thể kháng lại CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 100 μ M trở lên là, cao hơn 2 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 15 lần trở lên, 16 lần trở lên, 17 lần trở lên, 18 lần trở lên, 19 lần trở lên, hoặc 20 lần trở lên, so với hoạt tính liên kết đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, hoạt tính liên kết (KD) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μM trở lên là, hằng số phân ly (KD) là 9×10^{-7} M trở xuống, 8×10^{-7} M trở xuống, 7×10^{-7} M trở xuống, 6×10^{-7} M trở xuống, 5×10^{-7} M trở xuống, hoặc 4×10^{-7} M trở xuống, hoặc tốt hơn là, hằng số phân ly (KD) là 5×10^{-7} M trở xuống. Theo phương án khác, hoạt tính liên kết (KD) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ là quá lớn để tính toán bằng Biacore (hoạt tính liên kết yếu), hoặc hằng số phân ly (KD) là 1×10^{-7} M trở lên, 5×10^{-7} M trở lên, 7×10^{-7} M trở lên, 8×10^{-7} M trở lên, 9×10^{-7} M trở lên, 1×10^{-6} M trở lên, 2×10^{-6} M trở lên, 3×10^{-6} M trở lên, hoặc 4×10^{-6} M trở lên, hoặc tốt hơn là, hằng số phân ly (KD) là 1×10^{-6} M trở lên. Theo một phương án khác, hoạt tính liên kết (KD) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 100 μM trở lên là, 9×10^{-7} M trở xuống, 8×10^{-7} M trở xuống, 7×10^{-7} M trở xuống, 6×10^{-7} M trở xuống, 5×10^{-7} M trở xuống, 4×10^{-7} M trở xuống, 3×10^{-7} M trở xuống, 2×10^{-7} M trở xuống, hoặc 1×10^{-7} M trở xuống, hoặc tốt hơn là, hằng số phân ly (KD) là 2×10^{-7} M trở xuống. Theo phương án khác, hoạt tính liên kết (KD) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ là quá lớn để tính toán bằng Biacore (hoạt tính liên kết yếu), hoặc hằng số phân ly (KD) là 1×10^{-7} M trở lên, 5×10^{-7} M trở lên, 7×10^{-7} M trở lên, 8×10^{-7} M trở lên, 9×10^{-7} M trở lên, 1×10^{-6} M trở lên, 2×10^{-6} M trở lên, 3×10^{-6} M trở lên, hoặc 4×10^{-6} M trở lên, hoặc tốt hơn là, hằng số phân ly (KD) là 1×10^{-6} M trở lên.

Theo một phương án, hoạt tính liên kết (KD) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μM trở lên có hằng số phân ly (KD) là 8×10^{-8} M trở xuống, và hoạt tính liên kết (KD) đối với CD137 khi không có hợp chất này là quá lớn để tính toán bằng Biacore (hoạt tính liên kết yếu). Theo một phương án khác, hoạt tính liên kết (KD) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 100 μM có hằng số phân ly (KD) là 2×10^{-8} M trở xuống, và hoạt tính liên kết đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ là quá lớn để tính toán bằng Biacore (hoạt tính liên kết yếu).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong đó giá trị, [hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử thấp ở nồng độ 10 μ M trở lên]/[hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ]] là bằng hoặc lớn hơn giá trị của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong đó giá trị, [hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử thấp ở nồng độ 100 μ M trở lên]/[hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ]] là bằng hoặc lớn hơn giá trị của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu. Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu có thể được chọn từ các kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu là kháng thể chứa trình tự axit amin có A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A375/B167. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa A375/B167 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên khác, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A551/B379. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa

A551/B379 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ người (ví dụ, G1T3 (SEQ ID NO: 138) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nặng, chuỗi λ Lamlib của người (SEQ ID NO: 63) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nhẹ).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong đó hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ là bằng hoặc thấp hơn so với hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu, và hơn nữa, hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μ M trở lên là bằng hoặc lớn hơn hoạt tính liên kết (lượng liên kết) của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu đối với CD137 trong cùng điều kiện. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong đó hoạt tính liên kết đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ là bằng hoặc thấp hơn so với hoạt tính liên kết đối với CD137 của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu, và hơn nữa, hoạt tính liên kết (lượng liên kết) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μ M trở lên là bằng hoặc lớn hơn hoạt tính liên kết (lượng liên kết) của phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu đối với CD137 ở cùng điều kiện. Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu có thể được chọn từ các kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa trình tự axit amin có A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên khác, phân tử liên kết kháng

nguyên tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A375/B167. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa A375/B167 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A551/B379. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 tham chiếu là kháng thể kháng CD137 chứa A551/B379 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ người (ví dụ, G1T3 (SEQ ID NO: 138) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nặng, chuỗi λ Lamlib của người (SEQ ID NO: 63) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nhẹ).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong đó giá trị, [hoạt tính liên kết (KD) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử thấp ở nồng độ 1 μ M]/[hoạt tính liên kết (KD) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử thấp ở nồng độ 10 μ M trở lên] là bằng hoặc lớn hơn giá trị của phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong đó giá trị, [hoạt tính liên kết (KD) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử thấp ở nồng độ 1 μ M]/[hoạt tính liên kết (KD) đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử thấp ở nồng độ 100 μ M trở lên] là bằng hoặc lớn hơn giá trị của phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu. Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu có thể được chọn từ các kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu là kháng thể chứa trình tự axit amin có A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167,

A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu là kháng thể chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A375/B167. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là kháng thể chứa A375/B167 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là kháng thể chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 được chứa trong A551/B379. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu này là kháng thể chứa A551/B379 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên tham chiếu bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ người (ví dụ, G1T3 (SEQ ID NO: 138) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nặng, chuỗi λ Lamlib của người (SEQ ID NO: 63) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nhẹ).

Theo một phương án, hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD137 đối với CD137, khi có mặt, không có mặt, nồng độ cao và/hoặc nồng độ thấp của hợp chất phân tử nhỏ, được đo, ví dụ, bằng phương pháp bắt giữ phối tử sử dụng BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200 với quang phổ học cộng hưởng plasmon bề mặt làm nguyên tắc của phép đo.

Chi tiết của phương pháp đo hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD137 đối với CD137 được lấy làm ví dụ được mô tả dưới đây. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD137 đối với CD137 được đánh giá bằng BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200. Theo phương án được ưu tiên, thử nghiệm này sử dụng 20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, và 0,05% Tween 20 làm hệ đệm chạy, và được thực hiện ở 37°C. Theo một phương án, phép đo này được thực hiện sau khi bắt giữ kháng thể làm phối tử trên phân tử bắt giữ phối tử. Cụ thể là, lượng thích hợp (ví dụ, khoảng 100 RU, 200 RU, 300 RU, 400 RU, hoặc 500 RU) của kháng thể bị bắt giữ bằng cách cho dung dịch kháng thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ đệm chạy tương tác với chip được điều chế

đầu tiên bằng cách cố định Sure Protein A (GE Healthcare) trên chip cảm biến Series S CM3 (GE Healthcare).

Theo phương án được ưu tiên, khoảng từ 100 đến 500 RU, tốt hơn là khoảng 250 đến 400 RU kháng thể được bắt giữ. Tiếp theo, hoạt tính liên kết đối với CD137 khi có và không có hợp chất phân tử nhỏ được đánh giá bằng cách tiếp xúc dung dịch CD137 được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ đệm chạy được bổ sung hợp chất phân tử nhỏ tới nồng độ đích (ví dụ, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M hoặc 100 μ M), hoặc dung dịch CD137 được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ đệm chạy không chứa hợp chất phân tử nhỏ. Mặc dù nồng độ CD137 trong dung dịch CD137 có thể được xác định một cách thích hợp, ví dụ, khi hCD137-HisBAP (xem Ví dụ 1-1) được sử dụng làm kháng nguyên, phép đo được thực hiện sử dụng nồng độ kháng nguyên là 0 nM, 15,625 nM, 62,5 nM, 250 nM, và 1000 nM, tương ứng. Theo một phương án, hằng số phân ly (KD) của kháng thể kháng CD137 với CD137 của người được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Cụ thể là, hằng số tốc độ liên kết ka (L/mol/giây) và hằng số tốc độ phân ly kd (1/giây) được tính toán bởi phương pháp vẽ theo điểm toàn bộ biểu đồ thu được bằng phép đo sử dụng mô hình liên kết Langmuir 1:1. Hằng số phân ly KD (mol/L) được tính toán từ các giá trị này.

Các phương pháp thử nghiệm để đo hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD137 với CD137 được lấy làm ví dụ sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Khả năng liên kết của các kháng thể kháng CD137 với CD137 của người được đánh giá bằng Biacore T200. Khả năng liên kết đối với CD137 của người được đo bằng 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, và 0,05% Tween 20 làm hệ đệm chạy, và việc đo này được thực hiện ở 37°C. Đầu tiên, kháng thể có khoảng 250 đến 400 RU bị bắt giữ bằng cách cho dung dịch kháng thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ đệm chạy tương tác với chip nơi mà Sure Protein A (GE Healthcare) được cố định trên chip cảm biến chuỗi Series S CM3 (GE Healthcare). Tiếp theo, dung dịch CD137 của người được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ đệm chạy được bổ sung ATP ở nồng độ đích (ví dụ, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M hoặc 100 μ M), hoặc dung dịch CD137 của người được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ đệm chạy mà không chứa ATP, được tương tác để đánh giá hoạt tính liên kết đối với CD137 khi có và không có mặt ATP. hCD137-HisBAP được điều chế bằng phương pháp theo Ví dụ (1-1) được sử dụng làm CD137 của người là kháng nguyên, và phép đo này được thực hiện ở nồng độ kháng nguyên là 0 nM, 15,625 nM, 62,5 nM, 250 nM, và 1000 nM,

tương ứng. Chip này được tái tạo bằng cách sử dụng 25 mM NaOH và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5), và phép đo được thực hiện bằng cách bắt giữ lặp đi lặp lại các kháng thể. Hằng số phân ly của mỗi kháng thể đối với CD137 của người được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Cụ thể là, hằng số tốc độ liên kết k_a (L/mol/giây) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/giây) được tính toán bởi phương pháp vẽ theo điểm toàn bộ biểu đồ thu được bằng phép đo sử dụng mô hình liên kết Langmuir 1:1. Hằng số phân ly K_D (mol/L) được tính toán từ các giá trị này.

Theo một phương án, hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD137 đối với CD137 (tốt hơn là CD137 của người) cũng có thể được gọi bằng cách khác là “lượng liên kết CD137 trên mỗi lượng đơn vị kháng thể”. Cụ thể là, bằng cách sử dụng các đồ thị thu được bằng phương pháp thử nghiệm nêu trên sử dụng BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200, lượng liên kết CD137 với kháng thể (RU) được chia cho lượng kháng thể bắt giữ để tính toán “lượng liên kết CD137 trên mỗi lượng đơn vị kháng thể”. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD137 đối với CD137 (tốt hơn là CD137 của người) cũng có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 5-3 hoặc 6-2.

Các thuật ngữ “phân tử nhỏ” và “hợp chất phân tử nhỏ” đề cập đến chất hóa học có trong tự nhiên không phải “polyme sinh học” có trong cơ thể sống, hoặc chất hóa học không có trong tự nhiên. Tốt hơn là, nó là hợp chất đặc hiệu mô đích hoặc hợp chất không có trong tự nhiên, nhưng không giới hạn ở đó. Theo một phương án, “hợp chất phân tử nhỏ” theo sáng chế là “hợp chất đặc hiệu mô ung thư” hoặc “chất chuyển hóa đặc hiệu mô ung thư”. Thuật ngữ theo sáng chế “hợp chất đặc hiệu với mô ung thư (hợp chất đặc hiệu mô ung thư)” dùng để chỉ hợp chất tồn tại khác biệt trong mô khối u, so với mô không phải khối u. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ung thư” thường được sử dụng để mô tả khối u ác tính, và có thể di căn hoặc không di căn. Thuật ngữ “sự chuyển hóa” dùng để chỉ các sự thay đổi hóa học mà xảy ra trong mô cơ quan, bao gồm “đồng hóa” và “dị hóa”. Đồng hóa dùng để chỉ quá trình tổng hợp sinh học hoặc sự tích tụ các phân tử, và dị hóa dùng để chỉ sự phân hủy của các phân tử. “Chất chuyển hóa” là chất trung gian hoặc sản phẩm thu được từ quá trình chuyển hóa chất.

Thuật ngữ “mô đích” nghĩa là mô bất kỳ trong cơ thể sống mà phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được dự định phân phối tới. Mô đích này có thể là

mô có thể phân biệt được về mặt mô học chẳng hạn như các cơ quan khác nhau hoặc mô có thể phân biệt được về mặt bệnh lý chẳng hạn như các mô bình thường và các mô nhiễm bệnh. Theo các phương án nhất định, mô đích này là mô khối u. Ngược lại, “các mô không phải mô đích” nghĩa là các mô trong cơ thể sống không phải mô đích.

Thuật ngữ “mô khối u” nghĩa là mô bao gồm ít nhất một tế bào khối u. Nói chung, mô khối u được tạo thành từ tập hợp các tế bào khối u tạo nên cơ quan chính của khối u (nhu mô) và các mô liên kết và mạch máu tồn tại giữa các tế bào khối u và nâng đỡ khối u (mô đệm). Trong một số trường hợp, chúng có thể phân biệt được rõ ràng, nhưng có các trường hợp chúng bị trộn lẫn. Trong một số trường hợp, có các tế bào chẳng hạn như các tế bào miễn dịch đã xâm nhiễm vào mô khối u. Ngược lại, “mô không phải khối u” nghĩa là mô trong cơ thể sống không phải (các) mô khối u. Các mô khỏe mạnh không nhiễm bệnh/các mô bình thường là đại diện của các mô không phải khối u này.

Đối với phương án không giới hạn của hợp chất đặc hiệu mô ung thư, hoặc chất chuyển hóa đặc hiệu mô ung thư như được sử dụng trong sáng chế, ít nhất một hợp chất được chọn từ các hợp chất được nêu chi tiết dưới đây có thể được lấy làm ví dụ thích hợp. Ý nghĩa của “ít nhất một hợp chất” bao gồm, ngoài trường hợp hoạt tính liên kết kháng lại kháng nguyên bởi các miền liên kết kháng nguyên tương tự được mô tả sau đây phụ thuộc vào một loại hợp chất đặc hiệu mô ung thư hoặc chất chuyển hóa đặc hiệu mô ung thư, trường hợp hoạt tính liên kết phụ thuộc vào một số loại hợp chất đặc hiệu mô ung thư hoặc chất chuyển hóa đặc hiệu mô ung thư.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hợp chất đặc hiệu mô đích” dùng để chỉ hợp chất có trong mô đích một cách riêng biệt so với mô không phải mô đích. Theo một số phương án, hợp chất đặc hiệu mô đích có thể là hợp chất được xác định bởi tính đặc hiệu của mô đích định tính chẳng hạn như có trong mô đích nhưng không có trong mô không phải mô đích, hoặc có trong mô không phải mô đích nhưng không có trong mô đích. Theo phương án khác, hợp chất đặc hiệu mô đích có thể là hợp chất được xác định bởi tính đặc hiệu của mô đích định lượng chẳng hạn như có trong mô đích ở nồng độ khác (ví dụ, nồng độ cao hơn hoặc nồng độ thấp hơn) so với mô không phải mô đích. Theo phương án cụ thể, hợp chất đặc hiệu mô đích có trong mô đích ở nồng độ là, ví dụ, 1,05 lần trở lên, 1,1 lần trở lên, 1,15 lần trở lên, 1,2 lần trở lên, 1,25 lần trở lên, 1,3 lần trở lên, 1,35 lần trở lên, 1,4 lần trở lên, 1,45

lần trở lên, 1,5 lần trở lên, 1,55 lần trở lên, 1,6 lần trở lên, 1,65 lần trở lên, 1,7 lần trở lên, 1,75 lần trở lên, 1,8 lần trở lên, 1,85 lần trở lên, 1,9 lần trở lên, 1,95 lần trở lên, 2 lần trở lên, 2,1 lần trở lên, 2,2 lần trở lên, 2,3 lần trở lên, 2,4 lần trở lên, 2,5 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 10^3 lần trở lên, 10^4 lần trở lên, 10^5 lần trở lên, 10^6 lần trở lên, hoặc cao hơn so với mô không phải mô đích. Theo một phương án khác, hợp chất đặc hiệu mô đích có trong mô đích ở nồng độ là, ví dụ, 1,05 lần trở lên, 1,1 lần trở lên, 1,15 lần trở lên, 1,2 lần trở lên, 1,25 lần trở lên, 1,3 lần trở lên, 1,35 lần trở lên, 1,4 lần trở lên, 1,45 lần trở lên, 1,5 lần trở lên, 1,55 lần trở lên, 1,6 lần trở lên, 1,65 lần trở lên, 1,7 lần trở lên, 1,75 lần trở lên, 1,8 lần trở lên, 1,85 lần trở lên, 1,9 lần trở lên, 1,95 lần trở lên, 2 lần trở lên, 2,1 lần trở lên, 2,2 lần trở lên, 2,3 lần trở lên, 2,4 lần trở lên, 2,5 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 10^3 lần trở lên, 10^4 lần trở lên, 10^5 lần trở lên, 10^6 lần trở lên, hoặc cao hơn so với mô không phải mô đích. Theo phương án cụ thể, hợp chất đặc hiệu mô đích, so với mô không phải mô đích, có trong mô đích ở nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn đáng kể về mặt thống kê (tức là, như được xác định bằng cách sử dụng một trong số thử nghiệm t-test của Welch hoặc thử nghiệm tổng bậc của Wilcoxon, giá trị p nhỏ hơn 0,05 và/hoặc giá trị q nhỏ hơn 0,10). Theo phương án cụ thể, hợp chất đặc hiệu mô đích này là hợp chất đặc hiệu mô khối u.

Theo phương án cụ thể, hợp chất đặc hiệu mô khối u này là chất chuyển hóa tạo ra bởi quá trình chuyển hóa đặc hiệu với tế bào khối u. Chất chuyển hóa này có thể là sản phẩm tạo ra bởi sự chuyển hóa thiết yếu cho các hoạt động sống (chất chuyển hóa sơ cấp), hoặc sản phẩm tạo ra bởi sự chuyển hóa không nhất thiết cần thiết cho các hoạt động sống (chất chuyển hóa thứ cấp). Các ví dụ về chất chuyển hóa sơ cấp có thể bao gồm đường, protein, lipid, axit nucleic, và tương tự. Các ví dụ về chất chuyển hóa thứ cấp bao gồm kháng sinh và thuốc nhuộm. Chất chuyển hóa này có thể là polyme sinh học hoặc phân tử nhỏ. Theo phương án cụ thể, polyme sinh học này là phân tử có phân tử lượng khoảng 5000 trở lên mà bao gồm một hoặc nhiều loại đơn vị lặp, bao gồm, ví dụ, polysacarit, polypeptit, và polynucleotit. Theo phương án cụ thể, các phân tử nhỏ là phân tử có phân tử lượng khoảng 500 trở xuống và là các chất hóa học có trong cơ thể sống. Theo phương án khác, hợp chất đặc hiệu mô khối u này là chất chuyển hóa phân tử nhỏ đặc hiệu được tạo ra trong các tế bào khối u (Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, From

Molecular and Modular Tumor Therapy (2010) 3 (2), 111-132). Theo phương án khác, hợp chất đặc hiệu mô khối u là chất chuyển hóa được sản xuất một cách đặc hiệu bởi tế bào xâm nhập vào mô khối u (ví dụ, tế bào miễn dịch) hoặc tế bào đệm (ví dụ, nguyên bào sợi liên quan đến ung thư (CAF)) có trong mô khối u. Các ví dụ về các tế bào miễn dịch xâm nhập vào trong mô khối u là tế bào tua, tế bào tua ức chế, tế bào T điều hòa, tế bào T kiệt quệ (exhausted T cell), tế bào ức chế có nguồn gốc từ u tủy (MDSC), và tương tự. Theo phương án khác, chất chuyển hóa được sản xuất bởi các tế bào có trong mô khối u (ví dụ, tế bào khối u, tế bào miễn dịch, tế bào đệm, v.v.), mà được giải phóng ra bên ngoài tế bào khi các tế bào chết do sự chết tế bào theo chương trình hoặc hoại tử, hoặc tương tự, cũng có thể có trong các hợp chất đặc hiệu mô khối u theo sáng chế.

Để xác định hợp chất đặc hiệu mô khối u, phân tích ở mức độ bản phiên mã (ví dụ, Dhanasekaran et al. (Nature (2001) 41 2, 822-826), Lapointe et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 811-816), hoặc Perou et al. (Nature (2000) 406, 747-752)), phân tích ở mức độ proteome (ví dụ, Ahram et al. (Mol. Carcinog. (2002) 33, 9-15), và Hood et al. (Mol. Cell. Proteomics (2005) 4, 1741-1753)), và phân tích trao đổi chất tập trung vào profin chuyển hóa (chất chuyển hóa) có thể được sử dụng một cách thích hợp. Nghĩa là, để xác định chất chuyển hóa trong mẫu thử nghiệm, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Brindle et al. (J. Mol. Recognit. (1997) 10, 182-187)), phép đo khối phổ (GC/MS và LC/MS) (Gates and Sweeley (Clin. Chem. (1978) 24, 1663-1673)), và profin chuyển hóa sử dụng ELISA, và như vậy, có thể được sử dụng riêng và/hoặc kết hợp một cách thích hợp.

Theo phương án cụ thể, hợp chất đặc hiệu mô khối u là ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm: nucleosit có cấu trúc vòng purin, axit amin và chất chuyển hóa của nó, lipid và chất chuyển hóa của nó, chất chuyển hóa sơ cấp của quá trình chuyển hóa cacbonhydrat, cũng như nicotinamid và chất chuyển hóa của nó. Theo phương án khác, hợp chất đặc hiệu mô khối u là ít nhất một hợp chất được chọn từ điểm (1) đến (6) dưới đây:

(1) nucleosit có cấu trúc purin chẳng hạn như adenosin (ADO), adenosin triphosphat (ATP), adenosin diphosphat (ADP), adenosin monophosphat (AMP), và inosin;

- (2) axit amin chẳng hạn như alanin, axit glutamic và axit aspartic;
- (3) chất chuyển hóa của axit amin chẳng hạn như kynurenin, axit anthranilic, 3-hydroxykynurenin, và axit kynurenic;
- (4) chất chuyển hóa của axit arachidonic chẳng hạn như prostaglandin E2;
- (5) chất chuyển hóa sơ cấp của con đường phân hoặc chu trình Krebs chẳng hạn như axit lactic, axit succinic, và axit citric; và,
- (6) chất chuyển hóa của nicotinamid chẳng hạn như 1-metyl nicotinamid.

(1) Nucleosit có cấu trúc purin chẳng hạn như adenosin (ADO), adenosin triphosphat (ATP), adenosin diphosphat (ADP), adenosin monophosphat (AMP), và inosin

Được biết rằng, khi các tế bào khối u trải qua sự chết tế bào, lượng lớn ATP nội bào rò rỉ ra ngoài. Do đó, nồng độ ATP trong mô khối u là cao hơn đáng kể so với nồng độ ATP trong mô bình thường (PLoS One. (2008) 3, e2599). AMP được chuyển hóa bằng các enzym trên bề mặt tế bào chẳng hạn như 5'-nucleotidaza ngoại bào (ecto-5'-nucleotidaza) (CD73) (Resta and Thompson (Immunol. Rev. (1998) 161, 95- 109) và Sadej et al. (Melanoma Res. (2006) 16, 21 3-222)). Adenosin là nucleosit purin chủ yếu có trong môi trường ngoại bào ở nồng độ thấp, nhưng nồng độ adenosin ngoại bào tăng rõ rệt đã được báo cáo ở các mô thiếu oxy được phát hiện ở các khối u rắn (Blay and Hoskin (Cancer Res. (1997) 57, 260 2-2605)). CD73 được biểu hiện trên bề mặt của khối u và các tế bào miễn dịch (Kobie et al. (J. Immunol. (2006) 17 7, 6780-6786)) và hoạt tính tăng cao đã được phát hiện ở bệnh ung thư vú (Canbolat et al. (Breast Cancer Res. Treat. (1996) 37, 189-193)), bệnh ung thư dạ dày (Durak et al. (Cancer Lett. (1994) 84, 199-202)), bệnh ung thư tụy (Flocke and Mannherz (Biochim. Biophys. Acta (1991) 1076, 273-281)), và u nguyên bào đệm (Bardot et al. (Br. J. Cancer (1994) 70, 212-218)). Đã được đề xuất rằng sự tích tụ adenosin ở mô khối u là kết quả của việc tăng quá trình khử phosphoryl hóa của AMP bằng 5'-nucleotidaza bào tương (Headrick and Willis (Biochem. J. (1989) 261, 541-550)). Ngoài ra, các tế bào T điều hòa xâm nhập vào trong mô khối u cũng biểu hiện ATPaza và sản xuất adenosin (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (35), 13132-13137; Curr. Med. Chem. (2011) 18: 5217-5223). Adenosin được tạo ra được cho là giữ mô khối u trong môi trường ức chế miễn dịch

thông qua các thụ thể adenosin chẳng hạn như thụ thể A2A (Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223). Do đó, ATP, ADP, AMP, adenosin, và tương tự như vậy, được coi là được tích tụ ở nồng độ cao trong mô khối u bằng quá trình chuyển hóa nucleotit purin là ví dụ về các hợp chất đặc hiệu mô khối u được sử dụng theo sáng chế. Ngoài ra, vì adenosin trải qua quá trình phân hủy thành inosin bằng adenosin deaminaza, nên inosin được tích tụ ở nồng độ cao.

Theo phương án cụ thể, nucleosit có cấu trúc vòng purin bao gồm các hợp chất chứa adenosin. Theo các phương án cụ thể, các hợp chất chứa adenosin bao gồm, ví dụ, adenosin (ADO), adenosin triphosphat (ATP), adenosin diphosphat (ADP), adenosin monophosphat (AMP), adenosin monophosphat vòng (cAMP), deoxyadenosin (dADO), deoxyadenosin triphosphat (dATP), deoxyadenosin diphosphat (dADP), deoxyadenosin monophosphat (dAMP), adenosin [γ -thio]triphosphat (ATP γ S), và tương tự như vậy. Theo một phương án khác, nucleosit có cấu trúc vòng purin bao gồm inosin là chất chuyển hóa adenosin.

Ngoài ra, theo phương án cụ thể, nucleosit có cấu trúc vòng purin bao gồm nucleosit có cấu trúc vòng purin có sẵn trên thị trường chẳng hạn như ADPbetaS (Sigma Inc.) và tương tự như vậy.

(2) Axit amin chẳng hạn như alanin, axit glutamic và axit aspartic

Tốc độ hấp thu glutamin, hoạt động như chất mang nitơ trong cơ thể sống, được làm tăng trong các tế bào khối u, và sự kết hợp glutamin này và kết quả chuyển đổi thành axit glutamic và axit lactic (quá trình phân hủy glutamin (phân giải glutamin)) được cho là những đặc điểm của các tế bào khối u (Mazurek and Eigenbrodt (Anticancer Res. (2003) 23, 1149-1154, và Mazurek et al. (J. cell. Physiol. (1999) 181, 136-146). Mức độ glutamin trong huyết tương giảm ở các bệnh nhân ung thư, trong khi nồng độ axit glutamic tăng (Droge et al. (Immunobiology (1987) 174, 473-479)), và các nghiên cứu về sự chuyển hóa của glucoza được đánh dấu ^{13}C trong mô ung thư phổi thể hiện sự tương quan giữa các nồng độ của axit succinic được đánh dấu ^{13}C , alanin được đánh dấu ^{13}C , axit glutamic được đánh dấu ^{13}C , và xitrat được đánh dấu ^{13}C . Đối với các lý do trên, alanin, axit glutamic, axit aspartic và tương tự như vậy, được cho là được tích tụ ở các nồng độ cao trong mô khối u do, ví dụ, quá trình phân hủy glutamin, là các ví dụ về các hợp chất đặc hiệu mô khối u được sử dụng trong bản mô tả này.

(3) Chất chuyển hóa của axit amin chẳng hạn như kynurenin, axit anthranilic, 3-hydroxykynurenin, và axit kynurenic

Indoleamin 2,3-dioxygenaza (IDO) là enzym chuyển hóa tryptophan được biểu hiện cao ở nhiều bệnh ung thư chẳng hạn như ung thư hắc tố, ung thư ruột kết, ung thư thận và tương tự như vậy (Uyttenhove et al. (Nat. Med. (2003) 9, 1269-1274)). IDO xúc tác quá trình chuyển đổi tryptophan thành kynurenin. Trong u thần kinh đệm không biểu hiện IDO, kynurenin được sản xuất từ tryptophan bằng tryptophan 2,3-dioxygenaza (TDO) của gan (Opitz et al. (Nature (2011) 478 (7368), 197-203)). IDO cũng được biểu hiện trên các tế bào tua xâm nhập vào trong mô khối u, và các tế bào tua cũng tạo ra kynurenin (J. Immunol. (2008) 181, 5396-5404). Ngoài ra, IDO cũng được biểu hiện trong các tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy (MDSC) của mô khối u, và MDSC cũng tạo ra kynurenin (Yu et al. (J. Immunol. (2013) 190, 3783-3797)). Kynurenin được chuyển hóa thành axit anthranilic bằng kynureninaza, và thành 3-hydroxykynurenin bằng kynurenin 3-hydroxylaza. Cả axit anthranilic và 3-hydroxykynurenin đều được chuyển hóa thành axit 3-hydroxyanthranilic, tiền chất của NAD. Kynurenin được chuyển hóa thành axit kynurenic bằng kynurenin aminotransferaza. Vì các lý do này, kynurenin và chất chuyển hóa của nó, tức là, axit anthranilic, 3-hydroxykynurenin, axit kynurenic và các chất tương tự là các ví dụ về các hợp chất đặc hiệu mô khối u được sử dụng trong sáng chế, cụ thể là, chất chuyển hóa đặc hiệu tế bào khối u.

(4) Chất chuyển hóa của axit arachidonic chẳng hạn như prostaglandin E2

Prostaglandin E2 (PGE2) thúc đẩy sự tăng trưởng của các tế bào ung thư ruột kết và ức chế sự chết tế bào theo chương trình của chúng (Sheng et al. (Cancer Res. (1998) 58, 362-366)). Trong số các enzym tổng hợp PGE2, chủ yếu thấy rằng COX-1 được biểu hiện chủ yếu ở hầu hết các mô, trong khi COX-2 được gây ra bởi các gen gây ung thư và xytokin gây viêm nhất định trong khối u (Warner and Mitchell (FASEB J. (2004) 18, 790-804)). Sự biểu hiện quá mức của COX-2 đã được báo cáo là có liên quan tới tiên lượng xấu ở bệnh ung thư vú (Denkert et al. (Clin. Breast Cancer (2004) 4, 428-433)) và sự tiến triển bệnh nhanh chóng ở bệnh ung thư buồng trứng (Denker et al. (Mod. Pathol. (2006) 19, 1261-1269)). Ngoài ra, các tế bào T điều hòa xâm nhập vào trong mô khối u cũng tạo ra PGE2 (Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223). Vì các lý do này, chất chuyển hóa của axit arachidonic

chẳng hạn như PGE2 là các ví dụ về các hợp chất đặc hiệu mô khối u, cụ thể là chất chuyển hóa đặc hiệu tế bào khối u hoặc chất chuyển hóa đặc hiệu tế bào miễn dịch xâm nhập vào mô khối u. Bên cạnh PGE2, sự sản sinh Thromboxan A2 (TXA2) được tăng cường ở mô khối u chẳng hạn như các mô khối u trong ung thư ruột kết (J. Lab. Clin. Med. (1993) 122, 518-523).

(5) Chất chuyển hóa sơ cấp của con đường đường phân hoặc chu trình Krebs chẳng hạn như axit lactic, axit succinic và axit citric

Kiểu hình đường phân được đặc trưng bởi sự điều hòa tăng của các enzym đường phân (con đường Embden-Meyerhof) chẳng hạn như pyruvat kinaza, hexokinaza, và lactat dehydrogenaza (LDH) thường được biết đến là hiệu ứng Warburg, đặc điểm của khối u rắn. Axit lactic là sản phẩm cuối cùng của quá trình đường phân, và axit succinic và axit citric tạo ra bởi chu trình Krebs được biết là được tích tụ trong mô khối u (Teresa et al. (Mol. Cancer (2009) 8, 41-59)). Vì các lý do này, axit lactic, axit succinic, axit citric, và axit tương tự, là chất chuyển hóa sơ cấp tạo ra bởi quá trình đường phân, là các ví dụ về các hợp chất đặc hiệu mô khối u, cụ thể là chất chuyển hóa đặc hiệu tế bào khối u, được sử dụng trong sàng chế. Ngoài ra, được biết rằng do sự chết tế bào, succinat, có ở nồng độ cao trong các tế bào, rò rỉ ra ngoài tế bào (Nature Immunology, (2008) 9, 1261-1269). Đây được cho là lý do cho sự tăng nồng độ axit succinic ở mô khối u nơi mà sự chết tế bào thường xuyên xảy ra.

(6) Chất chuyển hóa của nicotinamid chẳng hạn như 1-metyl nicotinamid

Được biết rằng nicotinamid N-metyltransferaza được biểu hiện cao ở nhiều mô khối u của người. Cũng được biết rằng 1-metyl-nicotinamid, là chất chuyển hóa ổn định của nicotinamid tạo ra bởi enzym này, được tiết ra bên ngoài các tế bào khối u (Yamada et al. (J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2010) 56, 83-86)). Vì lý do này, 1-metyl nicotinamid, và chất tương tự, được cho là được tích tụ trong mô khối u ở nồng độ cao là kết quả của sự chuyển hóa nicotinamid là các ví dụ về các hợp chất đặc hiệu mô khối u được sử dụng trong sàng chế.

“Phân tử liên kết kháng nguyên” theo sàng chế bao gồm “miền liên kết kháng nguyên”. Đối với “miền liên kết kháng nguyên”, miền cấu trúc bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó liên kết với kháng nguyên đích. Theo một phương án,

miền liên kết kháng nguyên theo sáng chế này bao gồm, ví dụ, các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, Avimer chứa môđun (miền A) của khoảng 35 axit amin có trong các protein màng tế bào khác nhau trong cơ thể sống (WO2004/044011 và WO2005/040229), Adnectin chứa miền 10Fn3 của fibronectin là glycoprotein được biểu hiện trên màng tế bào (WO2002/032925), Affibody sử dụng làm khung miền liên kết IgG của 58 axit amin của Protein A (WO WO1995/001937), DARPin (protein chứa đoạn lặp Ankyrin được thiết kế) sử dụng đoạn lặp ankyrin (AR) là trình tự lặp 33 axit amin làm bazơ (WO2002/020565), Anticalin chứa lipocalin chẳng hạn như lipocalin liên kết với bạch cầu trung tính gelatinaza (NGAL) làm bazơ (WO2003/029462), các thụ thể lympho bào có thể biến đổi (VLR) là các protein có chức năng trong hệ thống đáp ứng miễn dịch của động vật có xương sống không hàm chẳng hạn như *Lampetra japonica* và *Eptatretus*, và chứa môđun đoạn lặp giàu leuxin (LRR) (WO2008/016854), và tương tự như vậy. Theo phương án cụ thể, miền liên kết kháng nguyên theo sáng chế này bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo phương án khác, miền liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm, ví dụ, scFv (chuỗi đơn Fv), kháng thể chuỗi đơn, Fv, scFv2 (chuỗi đơn Fv2), Fab, hoặc F(ab')₂.

HVR và vùng biến đổi

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, và 16; và (c) HVR-H3 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 17, 18, 19, hoặc 20. Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, và 16; và (c) HVR-H3 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 17, 18, 19, hoặc 20.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 là kháng thể chứa trình tự axit amin có A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379,

A555/B379, A548/B256, hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 dưới dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 chứa trong A375/B167. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 là kháng thể kháng CD137 chứa A375/B167 dưới dạng tổ hợp vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo phương án được ưu tiên khác, phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể kháng CD137 chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 có trình tự axit amin tương tự với HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 chứa trong A551/B379.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ: (a) HVR-L1 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, và 25; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 27, 28 và 29. Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, và 25; (b)

HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 27, 28 và 29.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 28.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 29.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 23; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế này bao gồm (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (ii) HVR-H2 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, và 16; và (iii) HVR-H3 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 17, 18, 19, hoặc 20; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, và 25; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (iii) HVR-L3 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 27, 28, và 29.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11; (c) HVR-H3

chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 28.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 29.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có

SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều axit amin bất kỳ của kháng thể kháng CD137 được mô tả ở trên được thay thế ở các vị trí HVR sau:

Ở HVR-H2 (SEQ ID NO: 30): các vị trí 5, 6, 7, 10, 13, 14, và/hoặc 17

Ở HVR-H3 (SEQ ID NO: 31): vị trí 3 và/hoặc 6

Ở HVR-L1 (SEQ ID NO: 32): các vị trí 4, 5, 9, và/hoặc 11

Ở HVR -L3 (SEQ ID NO: 33): các vị trí 6, 7, và/hoặc 8.

Theo phương án cụ thể, các đột biến thể được tạo ra bởi sáng chế là các đột biến thể bảo toàn. Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều đột biến thể bất kỳ sau đây có thể được thực hiện trong tổ hợp bất kỳ:

Ở HVR-H2 (SEQ ID NO: 8): K5H hoặc S; S6G; T7S; E10Y; D13E; S14Q; V17G hoặc L

Ở HVR-H3 (SEQ ID NO: 17): A3P, K hoặc I; F6E

Ở HVR-L1 (SEQ ID NO: 21): R4S; Y5T; Y9F; E11N

Ở HVR-L3 (SEQ ID NO: 27): E6P; H7A; Q8I

Tất cả các tổ hợp có thể có của các đột biến thể nêu trên được bao hàm trong các trình tự liên ứng của SEQ ID NO: 30, 31, 32 và 33 đối với HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1 và HVR-L3, tương ứng.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được làm tương thích với người. Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm HVR như trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và còn bao gồm khung người nhận, ví dụ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm HVR như trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự khung (FR). Theo một phương án, FR1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 35, FR2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 36, FR3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 37, và FR4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID No: 38. Theo một phương án, FR1 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 39, FR2 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 40, FR3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41, và FR4 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 42.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, hoặc 53. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có trình tự đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các đột biến thể (ví dụ, đột biến thể bảo toàn), đột biến cài xen, hoặc đột biến mất đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa trình tự đó giữ lại khả năng liên kết với CD137. Theo một vài phương án nhất định, tổng số từ 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, cài xen và/hoặc mất đoạn trong SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, hoặc 53. Theo một số phương án, các đột biến thể, đột biến cài xen, hoặc đột biến mất đoạn xảy ra ở các vùng nằm ngoài các HVR (tức là, ở các FR). Tùy ý, kháng thể kháng CD137 chứa trình tự VH trong SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, hoặc 53, bao gồm cả các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VH bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, và 16; và (c) HVR-H3 chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 17, 18, 19, hoặc 20. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở tận cùng N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ đến axit pyroglutamic bằng quá trình pyroglutamylation.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được tạo ra, trong đó kháng thể này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, hoặc 60. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có trình tự đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các đột biến thể (ví dụ, đột biến thể bảo toàn), đột biến cài xen, hoặc đột biến mất đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa trình tự đó giữ lại khả năng liên kết với CD137. Theo một số phương án nhất định, tổng số từ 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, cài xen và/hoặc mất đoạn trong SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, hoặc 60. Theo một số phương án, các đột

biến thể, đột biến cài xen, hoặc đột biến mất đoạn xảy ra ở các vùng nằm ngoài các HVR (nghĩa là, nằm trong các FR). Tùy ý, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa trình tự VL trong SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, hoặc 60, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VL bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, và 25; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 27, 28, và 29. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở tận cùng N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ đến axit pyroglutamic bằng quá trình pyroglutamyl hóa.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được tạo ra, trong đó kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này bao gồm VH như trong phương án bất kỳ trong số các phương án được đề xuất ở trên, và VL như trong phương án bất kỳ trong số các phương án được đề xuất ở trên.

- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 54, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 44 và SEQ ID NO: 55, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 55, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 46 và SEQ ID NO: 54, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 54, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.

- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 48 và SEQ ID NO: 56, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 57, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 50 và SEQ ID NO: 58, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 51 và SEQ ID NO: 59, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 51 và SEQ ID NO: 60, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 60, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 50 và SEQ ID NO: 59, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.
- Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD173 bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 53 và SEQ ID NO: 54, tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.

Các cải biến sau dịch mã nêu trên bao gồm nhưng không giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở tận cùng N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ đến axit pyroglutamic bằng quá trình pyroglutamyl hóa.

Các SEQ ID NO tương ứng với các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được ưu tiên và HVR1, 2, và 3 của chúng đối với mỗi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 1

Các vùng biến đổi chuỗi nặng / chuỗi nhẹ	SEQ ID NO của vùng biến đổi		SEQ ID NO của vùng siêu biến (HVR)					
	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375/B167	43	54	7	8	17	21	26	27
A372/B040	44	55	7	9	17	22	26	27
A356/B040	45	55	7	10	17	22	26	27
A486/B167	46	54	7	11	18	21	26	27
A487/B167	47	54	7	8	18	21	26	27
A488/B226	48	56	7	12	18	21	26	28
A489/B223	49	57	7	13	18	21	26	29
A548/B376	50	58	7	14	19	23	26	27
A551/B256	51	59	7	15	20	24	26	27
A551/B379	51	60	7	15	20	25	26	27
A555/B379	52	60	7	16	20	25	26	27
A548/B256	50	59	7	14	19	24	26	27
A549/B167	53	54	7	14	17	21	26	27

Khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được tạo ra ở đây có glutamin là axit amin tận cùng N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, thì axit amin đó có thể được thay thế bằng axit glutamic. Khi kháng thể kháng CD137 được tạo ra ở đây có axit glutamic là axit amin tận cùng N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, thì axit amin đó có thể được thay thế bằng glutamin.

Theo phương án được ưu tiên, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa các HVR được mô tả ở trên, các vùng biến đổi chuỗi nặng, và/hoặc các vùng biến đổi chuỗi nhẹ đều có hoạt tính liên kết phụ thuộc vào hợp chất có khối lượng phân tử thấp đối với CD137 như được mô tả ở trên.

Vùng hằng định

Theo một khía cạnh khác, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm vùng hằng định. Vùng hằng định này có thể là vùng hằng định chuỗi nặng (bao gồm vùng Fc), vùng hằng định chuỗi nhẹ, hoặc cả hai. Theo

một khía cạnh khác, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm vùng Fc. Theo một số phương án, vùng hằng định này là vùng có trình tự tự nhiên. Ví dụ về vùng hằng định chuỗi nặng có nguồn gốc từ các kháng thể tự nhiên bao gồm, ví dụ, vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người (SEQ ID NO: 61, 62), IgG2 của người, IgG3 của người, IgG4 của người, và tương tự như vậy. Ví dụ về vùng hằng định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ các kháng thể tự nhiên bao gồm, ví dụ, chuỗi kappa của người, chuỗi lambda của người (ví dụ, SEQ ID NO: 63), và tương tự như vậy.

“Vùng hằng định gốc” hoặc “vùng Fc gốc” được sử dụng ở đây dùng để chỉ vùng hằng định hoặc vùng Fc trước khi đưa vào (các) biến đổi axit amin được mô tả ở đây. “Phân tử liên kết kháng nguyên gốc” dùng để chỉ phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng hằng định gốc hoặc vùng Fc gốc. Theo một số phương án, vùng Fc gốc này là vùng Fc có trình tự tự nhiên (hoặc vùng Fc của kháng thể tự nhiên). Các kháng thể bao gồm, ví dụ, IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, v.v. Các kháng thể này có thể có nguồn gốc từ người hoặc khỉ (ví dụ, cynomolgus, rhesus macaque, marmoset, chimpanzee, hoặc baboon). Các kháng thể tự nhiên còn có thể bao gồm các đột biến có trong tự nhiên. Nhiều trình tự alotyp của các IgG do tính đa dạng nguồn gốc được mô tả trong "Sequences of proteins of immunological interest", Công bố NIH số 91-3242, và trình tự alotyp bất kỳ của các IgG có thể được sử dụng trong sáng chế. Theo một phương án, vùng Fc gốc này là vùng Fc có nguồn gốc từ vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người, được thể hiện trong SEQ ID NO: 61, 62, hoặc 182.

Theo một khía cạnh, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có điểm đẳng điện (pI) tăng, so với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc vùng Fc gốc. Theo một số phương án, các vùng Fc biến đổi bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin. Theo các phương án khác, sự biến đổi axit amin dẫn tới điểm đẳng điện (pI) của vùng Fc biến đổi tăng so với vùng Fc gốc. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, được tin rằng pH của các dịch sinh học (ví dụ, huyết tương) nằm trong khoảng pH trung tính. Trong các dịch sinh học, điện tích dương thực của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên làm tăng pI tăng lên do pI tăng, và kết quả là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này bị hút mạnh hơn bởi tương tác Coulomb hóa lý với bề mặt tế bào màng trong mà có điện tích âm thực so với kháng thể hoặc

phân tử liên kết kháng nguyên không có pI tăng. Bằng cách này, phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận (hoặc kháng thể), hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận được liên kết kháng nguyên (hoặc kháng thể) có thể đến gần hơn tới bề mặt các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc, dẫn đến tăng khả năng liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên với các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc. Đối với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137 thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 dựa trên sự đóng góp bởi hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137 có khả năng liên kết với các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc tăng do các biến đổi axit amin làm tăng pI có thể bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 mạnh hơn so với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137 không có các biến đổi axit amin làm tăng pI.

Theo sáng chế, pI có thể là pI được xác định dựa trên thực nghiệm hoặc lý thuyết. Giá trị pI có thể được xác định, ví dụ, bằng cách tập trung điểm đẳng điện đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Giá trị pI trên lý thuyết có thể được tính toán, ví dụ, sử dụng phần mềm phân tích gen và trình tự axit amin (Genetyx, v.v.). Trong quá trình tính toán, các đặc tính của kháng thể có thể được phản ánh trong công thức tính. Ví dụ, (i) thông thường, Cys được bảo toàn trong kháng thể tạo thành liên kết disulfua và không tích điện của chuỗi bên; do đó, Cys này có thể được loại khỏi bước tính toán và chỉ Cys dạng tự do không tạo liên kết disulfua có thể được đưa vào tính toán. Theo cách khác, (ii) trạng thái điện tích hoặc điểm đẳng điện của các kháng thể có thể thay đổi do các cải biến sau dịch mã; do đó, công thức tính có thể được thay đổi như sau, xét đến các cải biến sau dịch mã này: (a) khi tận cùng N của chuỗi nặng là Q (glutamin), nhóm amino tận cùng N được loại khỏi bước tính toán, giả sử quá trình pyroglutamyl hóa xảy ra, (b) khi tận cùng C của chuỗi nặng là K (lysin), K (chỉ một gốc) được loại khỏi bước tính toán, giả sử sự cắt bỏ xảy ra; và (c) các chuỗi bên của toàn bộ C (xystein) có ở các vị trí thường được bảo toàn được loại khỏi bước tính toán, giả sử tất cả các C này tạo thành liên kết disulfua trong phân tử. Theo một phương án được ưu tiên, cả (i) và (ii) được mô tả ở trên có thể được phản ánh trong công thức tính.

Theo một phương án, giá trị pI có thể được tăng, ví dụ, ít nhất bằng 0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, hoặc cao hơn, ít nhất bằng 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, hoặc

cao hơn, ít nhất bằng 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, hoặc cao hơn, hoặc ít nhất bằng 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0 hoặc cao hơn, so với cái biến trước đó.

Theo một phương án, sự biến đổi axit amin liên quan đến sự tăng pI và phương pháp làm tăng pI của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được mô tả chi tiết ở đây ở mục “III. Các phương pháp và chế phẩm (phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc biến đổi với điểm đẳng điện (pI) tăng)”. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các biến đổi axit amin và phương pháp làm tăng pI bất kỳ được mô tả ở mục “III. Các phương pháp và chế phẩm (phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc biến đổi với điểm đẳng điện (pI) tăng)” có thể được áp dụng cho các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có vùng Fc biến đổi với pI tăng, và vùng Fc biến đổi bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422, và 431, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, các vùng Fc biến đổi với pI tăng bao gồm Arg hoặc Lys tại mỗi vị trí được chọn.

Theo các phương án khác, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có vùng Fc biến đổi với pI tăng, và vùng Fc biến đổi bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 311, 343, và 413, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, vùng Fc biến đổi với pI tăng bao gồm sự biến đổi axit amin tại vị trí 311, 343, hoặc 413 theo cách đánh số EU. Theo phương án khác, vùng Fc biến đổi với pI tăng bao gồm Arg hoặc Lys tại mỗi vị trí được chọn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa vùng Fc biến đổi với pI tăng, bao gồm sự biến đổi axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (3) sau đây: (1) tại các vị trí 311 và 343; (2) tại các vị trí 311 và 413; và (3) tại các vị trí 343 và 413, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, vùng Fc biến đổi với pI tăng bao gồm Arg hoặc Lys tại mỗi vị trí được chọn.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến đổi bao gồm (các) biến đổi axit amin được xác định trong Bảng 2 dưới đây.

Sự biến đổi axit amin để làm tăng pI của vùng Fc

Bảng 2

Số	Đột biến thể axit amin (cách đánh số EU)
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm vùng Fc biến đổi được điều chế bằng thực hiện (các) biến đổi axit amin thành vùng Fc có trình tự tự nhiên. Theo một phương án, vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng đối với ít nhất một thụ thể gamma Fc được chọn từ nhóm bao gồm Fc-gamma RIa, Fc-gamma RIIa, Fc-gamma RIIb, Fc-gamma RIIIa, và Fc-gamma RIIIb, so với vùng Fc có trình tự tự nhiên hoặc vùng Fc gốc. Tốt hơn là, vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng đối với Fc-gamma RIIb, so với vùng Fc có trình tự tự nhiên hoặc vùng Fc gốc. Đã được báo cáo rằng kháng thể kháng CD137 chứa vùng Fc biến đổi với hoạt tính liên kết tăng đối với Fc-gamma RIIb đã làm tăng hoạt tính chủ vận, so với kháng thể kháng CD137 chứa vùng Fc với trình tự tự nhiên. Theo một phương án, vì các biến đổi axit amin để làm tăng hoạt tính liên kết đối với Fc-gamma RIIb, các biến đổi axit amin được nêu trong WO2012/115241, WO2014/030728, WO2014/163101, và/hoặc WO2017/104783 có thể được sử dụng, ví dụ. Theo một phương án được ưu tiên, các biến đổi để làm tăng hoạt tính liên kết đối với Fc-gamma RIIb là (các) biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326, và 330, theo cách đánh số EU.

“Các thụ thể gamma Fc” (ở đây, dùng để chỉ các thụ thể gamma Fc, Fc gamma R hoặc FcγR) dùng để chỉ các thụ thể có thể liên kết với vùng Fc của các

kháng thể đơn dòng IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, và thực tế có nghĩa là thành phần bất kỳ của họ các protein được mã hóa bởi các gen thụ thể gamma Fc. Ở người, họ này bao gồm Fc gamma RI (CD64) bao gồm các đồng phân Fc gamma RIa, Fc gamma RIb, và Fc gamma RIc; Fc gamma RII (CD32) bao gồm các đồng phân Fc gamma RIIa (bao gồm alotyp H131 (kiểu H) và R131 (kiểu R)), Fc gamma RIIf (bao gồm Fc gamma RIIf-1 và Fc gamma RIIf-2), và Fc gamma RIIfc; và Fc gamma RIII (CD16) bao gồm các đồng phân Fc gamma RIIIa (bao gồm alotyp V158 và F158), và Fc gamma RIIIb (bao gồm alotyp Fc gamma RIIIb-NA1 và Fc gamma RIIIb-NA2), và các Fc gamma R bất kỳ ở người, các alotyp hoặc đồng phân Fc gamma R vẫn chưa được bộc lộ, nhưng không giới hạn ở đó. Fc gamma RIIf1 và Fc gamma RIIf2 đã được báo cáo là các biến thể ghép nối của Fc gamma RIIf của người. Ngoài ra, biến thể ghép nối được gọi là Fc gamma RIIf3 đã được báo cáo (J Exp Med, 1989, 170: 1369-1385). Ngoài các biến thể ghép nối này, Fc gamma RIIf của người bao gồm AAI46679.1 được đăng ký tại NCBI và tất cả các biến thể ghép nối được đăng ký tại NCBI, là NP_001002273.1, NP_001002274.1, NP_001002275.1, NP_001177757.1, và NP_003992.3. Ngoài ra, Fc gamma RIIf của người bao gồm mọi tính đa dạng nguồn gốc đã được báo cáo trước đó, cũng như Fc gamma RIIf (Arthritis Rheum. 48: 3242-3252 (2003); Kono et al., Hum. Mol. Genet. 14: 2881-2892 (2005); và Kyogoku et al., Arthritis Rheum. 46: 1242-1254 (2002)), và mọi tính đa dạng nguồn gốc sẽ được báo cáo sau này.

Ở Fc gamma RIIa, có hai alotyp, một tại axit amin tại vị trí 131 của Fc gamma RIIa là histidin (kiểu H) và alotyp còn lại tại axit amin tại vị trí 131 được thể bằng arginin (kiểu R) (Warrmerdam, J. Exp. Med. 172: 19-25 (1990)).

Fc gamma R bao gồm các Fc gamma R có nguồn gốc từ người, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, và khỉ nhưng không giới hạn ở đó, và có thể có nguồn gốc từ cơ quan bất kỳ. Fc gamma R của chuột nhắt bao gồm Fc gamma RI (CD64), Fc gamma RII (CD32), Fc gamma RIII (CD16), và Fc gamma RIII-2 (CD16-2), và Fc gamma R của chuột bất kỳ, hoặc các đồng phân Fc gamma R, nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng đối với Fc-gamma RIIf, bao gồm các biến đổi axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (8) sau đây: (1) tại các vị trí 234, 238, 264, và 330; (2) tại các vị

trí 234, 238, và 330; (3) tại các vị trí 234, 237, 238, và 330; (4) tại các vị trí 236, 268, và 330; (5) tại các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, và 330; theo cách đánh số EU.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến đổi bao gồm biến đổi axit amin được xác định trong Bảng 3 dưới đây. Theo phương án khác, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến đổi còn bao gồm, ngoài (các) biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 2 (các biến đổi axit amin liên quan đến pI tăng của vùng Fc), một tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin được xác định trong Bảng 3 dưới đây.

Các biến đổi axit amin để làm tăng hoạt tính liên kết Fc-gamma RIIb của vùng Fc

Bảng 3

Số	Đột biến thể axit amin (cách đánh số EU)
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các vùng Fc biến đổi, bao gồm các vùng Fc biến đổi có sự biến đổi của ít nhất một axit amin và có hoạt tính liên kết đối với Fc-gamma RIIb tương đương hoặc cao hơn so với vùng Fc tham chiếu. Theo một phương án, vùng Fc tham chiếu này là vùng Fc chứa một tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin được xác định trong Bảng 3 nêu trên. Theo một phương án được ưu tiên, vùng Fc tham chiếu này là vùng Fc được bao gồm trong miền hằng định chuỗi nặng TT14 (SEQ ID NO: 149), TT16 (SEQ ID NO: 150), MY201 (SEQ ID NO: 153), hoặc MY518 (SEQ ID NO: 154). Theo một phương án được ưu tiên, vùng Fc tham chiếu này là vùng Fc được bao gồm trong vùng hằng định chuỗi nặng MY201 (SEQ ID NO: 153) hoặc MY518 (SEQ ID NO: 154).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận được phân lập bao gồm vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng đối với thụ thể gamma Fc (tốt hơn là, Fc-gamma RIIb) và pI tăng. Theo một số phương án nhất định, vùng Fc biến đổi được mô tả ở đây bao gồm ít

nhất hai sự biến đổi axit amin trong vùng Fc gốc. Như được mô tả ở trên, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có pI tăng bị hút mạnh hơn bởi tương tác Coulomb hóa lý với bề mặt tế bào màng trong mà có điện tích âm thực so với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên không có pI tăng. Do đó, đối với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận mà thể hiện hoạt tính chủ vận dựa trên sự đóng góp bởi hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc (tốt hơn là Fc-gamma RIIb), hoạt tính chủ vận của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có thể được tăng lên bằng cách kết hợp (các) biến đổi axit amin để làm tăng thụ thể gamma Fc (tốt hơn là Fc-gamma RIIb) và (các) biến đổi axit amin để làm tăng pI.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bao gồm vùng Fc biến đổi bao gồm cả (các) biến đổi axit amin để làm tăng hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc (ví dụ, Fc-gamma RIIb) và (các) biến đổi axit amin để làm tăng điểm đẳng điện (pI), được mô tả ở trên. Như được mô tả ở trên, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có pI tăng bị hút mạnh hơn bởi tương tác Coulomb hóa lý với bề mặt tế bào màng trong mà có điện tích âm thực so với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên không có pI tăng. Do đó, đối với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137 mà thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 dựa trên sự đóng góp bởi hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc (tốt hơn là Fc-gamma RIIb), hoạt tính chủ vận của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được tăng lên bằng cách kết hợp (các) biến đổi axit amin để làm tăng thụ thể gamma Fc (tốt hơn là Fc-gamma RIIb) và (các) biến đổi axit amin để làm tăng pI.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng đối với Fc-gamma RIIb và có pI tăng, bao gồm ít nhất ba sự biến đổi axit amin bao gồm (a) ít nhất một biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326, và 330, theo cách đánh số EU, và (b) ít nhất hai sự biến đổi axit amin của ít nhất hai các vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 311, 343, và 413, theo cách đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng đối với Fc-gamma RIIb và pI tăng, bao gồm sự biến đổi axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (26) sau đây:

- (1) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343, và 413;
- (2) các vị trí 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343, và 413;
- (3) các vị trí 234, 238, 250, 264, 307, 330, 343, và 413;
- (4) các vị trí 234, 238, 264, 330, 343, và 413;
- (5) các vị trí 234, 237, 238, 250, 307, 330, 343, và 413;
- (6) các vị trí 234, 237, 238, 330, 343, và 413;
- (7) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, 311, và 343;
- (8) các vị trí 234, 238, 250, 264, 307, 330, 311, và 343;
- (9) các vị trí 234, 238, 264, 330, 311, và 343;
- (10) các vị trí 234, 237, 238, 250, 307, 330, 311, và 343;
- (11) các vị trí 234, 237, 238, 330, 311, và 343;
- (12) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 343;
- (13) các vị trí 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 343;
- (14) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 413;
- (15) các vị trí 214, 236, 268, 330, và 343;
- (16) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, và 343;
- (17) các vị trí 214, 236, 268, 330, và 413;
- (18) các vị trí 214, 236, 268, 330, 343, và 413;
- (19) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, 343, và 413;
- (20) các vị trí 214, 236, 268, 330, và 311;
- (21) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, và 311;
- (22) các vị trí 214, 236, 268, 330, 311, và 343;
- (23) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, 311, và 343;
- (24) các vị trí 214, 236, 268, 330, 311, và 413;
- (25) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, 311, và 413;
- (26) các vị trí 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 311,

theo cách đánh số EU.

Theo một phương án, vùng Fc biến đổi theo sáng chế bao gồm một tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin được xác định trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Số	Đột biến thể axit amin (cách đánh số EU)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R
16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

Theo một phương án, vùng Fc biến đổi chứa tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 4 ở trên thiếu hụt axit amin tại vị trí 447 theo cách đánh số EU. Theo phương án được ưu tiên, vùng Fc biến đổi chứa tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 4 ở trên thiếu hụt axit amin tại các vị trí 446 và 447 theo cách đánh số EU.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng ít nhất một biến đổi axit amin để làm tăng hoạt tính liên kết đối với Fc-gamma R (bao gồm Fc-gamma RIIB) so với vùng Fc gốc như được mô tả hoặc gợi ý, ví dụ, trong WO2013/047752, WO2013/125667, WO2014/030728, WO2014/163101, hoặc WO2017104783, và ít nhất một biến đổi axit amin làm tăng pI so với vùng Fc gốc như được mô tả hoặc gợi ý, ví dụ, trong WO2017/104783, WO2017/046994, và tổ hợp bất kỳ của các biến đổi axit amin này có thể được sử dụng, ngoài các biến đổi được đề xuất như các minh họa ở trên.

Ngoài ra, các biến đổi axit amin được thực hiện cho (các) mục đích khác có thể được kết hợp với vùng Fc biến đổi được mô tả ở đây. Ví dụ, đột biến thể axit amin mà làm tăng hoạt tính liên kết với FcRn (Hinton et al., J. Immunol. 176(1): 346-356 (2006); Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281(33): 23514-23524 (2006); Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006); Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2): 157-159 (2010); WO 2006/019447; WO 2006/053301; và WO 2009/086320), và đột biến thể axit amin để cải thiện tính ổn định hoặc tính không đồng nhất của kháng thể (WO 2009/041613) có thể được bổ sung. Theo cách khác, polypeptit có đặc tính thúc đẩy thải trừ kháng nguyên, được mô tả trong WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 hoặc WO 2013/180201, polypeptit có đặc tính liên kết đặc hiệu với mô đích, được mô tả trong WO 2013/180200, polypeptit có đặc tính dễ liên kết lặp lại với nhiều phân tử kháng nguyên, được mô tả trong WO 2009/125825, WO 2012/073992 hoặc WO 2013/047752, có thể được kết hợp với vùng Fc biến đổi được mô tả ở đây. Theo cách khác, đối với mục đích gây ra hoạt tính liên kết với các kháng nguyên khác, các biến đổi axit amin được bộc lộ trong EP1752471 và EP1772465 có thể được kết hợp với CH3 của vùng Fc biến đổi được mô tả ở đây.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 64-85. Tốt hơn là, các kháng thể hoặc

phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 75 hoặc 82.

Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa vùng Fc biến đổi được mô tả ở trên có hoạt tính liên kết với CD137 được mô tả ở trên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi và vùng hằng định sau: vùng biến đổi chứa HVR được mô tả ở trên, vùng biến đổi chuỗi nặng, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ; và vùng Fc biến đổi được mô tả ở trên. Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có thể là một kháng thể kháng CD137 bất kỳ được chọn từ các kháng thể được mô tả trong Bảng 52.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cùng một epitop trên CD137 làm kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đề xuất ở đây, khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp (ví dụ, khi có mặt 10 micromol trở lên, 50 micromol trở lên, 100 micromol trở lên, 150 micromol trở lên, 200 micromol trở lên, hoặc 250 micromol trở lên hợp chất có khối lượng phân tử thấp). Ví dụ, theo phương án nhất định, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được đề xuất liên kết với cùng một epitop với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, và/hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17, ở dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ nhận biết epitop được tạo thành bởi phức hợp được tạo thành từ kháng nguyên (ví dụ, CD137) và hợp chất có khối lượng phân tử thấp (ví dụ, ATP).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên cạnh tranh để liên kết với CD137 với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đề xuất ở đây, khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp (ví dụ, khi có mặt 10 micromol trở lên, 50 micromol trở lên, 100

micromol trở lên, 150 micromol trở lên, 200 micromol trở lên, hoặc 250 micromol trở lên hợp chất có khối lượng phân tử thấp). Ví dụ, theo phương án nhất định, sự cạnh tranh vị trí liên kết với CD137 này với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, và/hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17, ở dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể người. Theo một phương án, kháng thể kháng CD137 là đoạn kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, diabody, hoặc đoạn F(ab')₂. Theo một phương án khác, kháng thể này là kháng thể có độ dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1 nguyên vẹn hoặc lớp hoặc isotyp kháng thể khác như được xác định ở đây.

Theo khía cạnh khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể kết hợp các đặc điểm bất kỳ, riêng hoặc kết hợp, như được mô tả trong Phần 1-7 dưới đây:

1. Hoạt tính chủ vận của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có hoạt tính chủ vận CD137. Tín hiệu CD137 không chỉ kích thích quá trình bài tiết IFN- γ và quá trình tăng sinh của tế bào NK (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998), mà còn tăng cường khả năng sống sót của chúng và sự hoạt hóa DC được chỉ ra bởi sự điều hòa tăng của các phân tử kích thích đồng thời và quá trình bài tiết xytokin (Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002). Tuy nhiên, CD137 được đặc trưng rõ ràng nhất dưới dạng phân tử kích thích đồng thời điều hòa sự hoạt hóa gây ra bởi TCR ở cả tập con CD4⁺ và CD8⁺ của các tế bào T. Khi kết hợp với sự hoạt hóa TCR, các kháng thể chủ vận kháng CD137 tăng cường sự tăng sinh tế bào T, kích thích quá trình bài tiết lymphokin, và làm giảm tính nhạy của các lympho bào T với sự chết tế bào gây ra bởi sự hoạt hóa (được đánh giá trong Snet et al., 2011). Trong số các hiện tượng đó, các hiện tượng sinh lý quan sát được sau khi tín hiệu CD137 trên các tế bào T được

trung gian bởi các tín hiệu xuôi dòng được hoạt hóa bởi tín hiệu CD137, chẳng hạn như TRAF2, TRAF1, cụ thể là NF-kappaB, JNK, Erk, Akt, survivin, Bcl-XL, và/hoặc Bcl-2 (Ward-Kavanagh et al., Immunity, 44: 1005 (2016)).

Theo một phương án, “phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137” hoặc “kháng thể chủ vận kháng CD137” là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên, bằng cách liên kết với CD137, truyền tín hiệu CD137, và gây ra hoặc tăng cường đáng kể sự bài tiết IFN-gamma, sự tăng sinh, và làm tăng khả năng sống sót của tế bào NK; sự hoạt hóa DC được chỉ ra bởi sự điều hòa tăng của quá trình bài tiết xytokin và các phân tử kích thích đồng thời; cảm ứng TCR; sự tăng sinh tế bào T; và/hoặc quá trình bài tiết lymphokin. Theo phương án khác, “phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137” hoặc “kháng thể chủ vận kháng CD137” là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên truyền tín hiệu CD137 bằng cách liên kết với CD137 trên các tế bào T, và gây ra sự hoạt hóa NF-kappaB của các tế bào T một cách đáng kể. Ngoài ra, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên “thể hiện hoạt tính chủ vận CD137” có nghĩa là hiện tượng sinh lý bất kỳ trong số các hiện tượng sinh lý nêu trên được quan sát khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với CD137. Phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 được mô tả chi tiết trong phần “C. Các thử nghiệm” dưới đây.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án không giới hạn, hoạt tính chủ vận CD137 của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 kháng lại CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn hoạt tính chủ vận CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo phương án khác, hoạt tính chủ vận CD137 của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ với nồng độ cao là cao hơn so với hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ với nồng độ thấp. Theo phương án khác, hoạt tính chủ vận CD137 của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ là 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 200 lần trở lên, 300 lần trở lên, 500 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 2×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 5×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 2×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 5×10^4 lần trở lên, hoặc 1×10^5 lần trở lên, so với hoạt tính chủ vận CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Nồng độ thích hợp bất kỳ có thể được lựa chọn làm nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ miễn là sự khác biệt ở hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được phát hiện. Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 truyền tín hiệu CD137 bằng cách liên kết với CD137 trên bề mặt tế bào. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc hợp chất phân tử nhỏ có hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ. Tuy nhiên, mặt khác, vì các phương pháp đo hoạt tính liên kết và hoạt tính chủ vận này là khác nhau, nên người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ đối với sự khác biệt về hoạt tính liên kết được phát hiện có thể khác với nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ đối với sự khác biệt về hoạt tính chủ vận được phát hiện (ví dụ, đối với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μM là 2 lần trở lên so với hoạt tính liên kết CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ, hoạt tính chủ vận CD137 (giá trị thử nghiệm) khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μM có thể là thấp hơn 2 lần so với hoạt tính chủ vận CD137 (giá trị thử nghiệm) khi không có hợp chất phân tử nhỏ). Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể hiểu rằng việc xác định hoạt tính chủ vận có thể thay đổi phụ thuộc vào thử nghiệm hoạt tính chủ vận CD137 (xem phần “C. Các thử nghiệm”).

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 (i) thể hiện hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , hoặc 250 μM , và (ii) về căn bản không thể hiện hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ, hoặc có hoạt tính chủ vận thấp đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ (so với khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ).

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh giá bằng “a) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (PBMC)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, thì kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 (i) bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 250 μM , và (ii) có hoạt tính chủ vận thấp đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ (so với khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ). Theo phương án khác, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng

nguyên kháng CD137 (i) thể hiện hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ ở nồng độ 250 μ M, và (ii) về căn bản không thể hiện hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh giá bằng “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, thì kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 (i) bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ, và (ii) về căn bản không có hoạt tính chủ vận đối với CD137 hoặc có hoạt tính chủ vận thấp hơn khi không có hợp chất phân tử nhỏ (so với hoạt tính chủ vận khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ). Các nồng độ kháng thể trong thử nghiệm gen chỉ thị có thể được chọn một cách tùy ý, ví dụ, nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, hoặc 10 μ g/mL. Theo phương án được ưu tiên, nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0,1 μ g/mL hoặc 1 μ g/mL.

Theo một phương án, khi nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0,1 μ g/mL trong “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, (i) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt 10 μ M hợp chất phân tử nhỏ là 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, khi nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0,1 μ g/mL trong “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, (i) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt 100 μ M hợp chất phân tử nhỏ là 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, khi nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0,1 μ g/mL trong “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, (i) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt 250 μ M hợp chất

phân tử nhỏ cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Hơn nữa, theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 về căn bản không bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, khi nồng độ cuối cùng của kháng thể là 1 $\mu\text{g/mL}$ trong “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, (i) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt 10 μM hợp chất phân tử nhỏ cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, khi nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0,1 $\mu\text{g/mL}$ trong “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, (i) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt 100 μM hợp chất phân tử nhỏ cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, khi nồng độ cuối cùng của kháng thể là 0,1 $\mu\text{g/mL}$ trong “b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)” được giải thích chi tiết trong “C. Các thử nghiệm”, (i) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 khi có mặt 250 μM hợp chất phân tử nhỏ cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Hơn nữa, theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, 1 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 về căn bản không bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

2. Các đoạn kháng thể

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất ở đây là đoạn kháng thể. Các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đoạn Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, và scFv, và các đoạn khác được mô tả dưới đây. Để xem lại một số đoạn kháng thể, xem Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Để xem lại về các đoạn scFv, xem, ví dụ, Pluckthun, trong *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tập 113, Rosenberg và Moore eds., (Springer-Verlag, New York), trang 269-315 (1994); cũng xem WO 93/16185; và Patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để thảo luận về các đoạn Fab và F(ab')₂ chứa các gốc epitop liên kết thụ thể thu hồi và có thời gian bán thải *in vivo* tăng, xem Patent Mỹ số 5,869,046.

Diabody là các đoạn kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên mà có thể là thể lưỡng trị hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); và Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Triabody và thể tetrabody cũng được mô tả trong Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Các kháng thể miền đơn là các đoạn kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,248,516 B1).

Các đoạn kháng thể có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở kỹ thuật tiêu hóa phân giải protein một kháng thể nguyên vẹn cũng như sản sinh bởi tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả ở đây.

3. Kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất ở đây là kháng thể khảm. Một số kháng thể khảm được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Trong một ví dụ, kháng thể khảm chứa vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi thu được từ chuột nhắt, chuột cống, chuột túi má, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người, chẳng hạn như khỉ) và vùng hằng định của người. Theo một ví dụ khác

nữa, kháng thể thể khảm là kháng thể “được chuyển lớp” trong đó lớp hoặc phân lớp này đã được thay đổi so với lớp hoặc phân lớp của kháng thể gốc. Các kháng thể khảm bao gồm các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể khảm là kháng thể được làm tương thích với người. Cụ thể là, kháng thể không phải của người được làm tương thích với người để làm giảm khả năng gây miễn dịch với người, trong khi vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể gốc không phải của người này. Nói chung, kháng thể được làm tương thích với người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, ví dụ, CDR, (hoặc một phần của chúng) thu được từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc một phần của chúng) thu được từ các trình tự kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất là một phần của vùng hằng định của người. Trong một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm tương thích với người được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà các gốc HVR thu được từ đó), ví dụ, để phục hồi hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực kháng thể.

Các kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp tạo ra chúng được đánh giá, ví dụ, trong Almagro và Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), và được mô tả thêm, ví dụ, trong Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); Patent Mỹ số 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri et al., *Methos* 36:25-34 (2005) (mô tả sự ghép vùng quyết định tính đặc hiệu (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (mô tả “sự tái tạo bề mặt”); Dall’Acqua et al., *Methos* 36:43-60 (2005) (mô tả “sự xáo trộn FR”); và Osbourn et al., *Methos* 36:61-68 (2005) và Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (mô tả phương pháp “lựa chọn được hướng dẫn” để xáo trộn FR).

Các vùng khung của người mà có thể được sử dụng để làm tương thích với người bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các vùng khung được lựa chọn bằng cách sử dụng phương pháp “khớp-tốt nhất” (xem, ví dụ, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); các vùng khung thu được từ trình tự liên ứng của các kháng thể người của phân nhóm cụ thể của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (xem, ví dụ, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); các vùng khung thành thực của người (được gây đột biến soma) hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, Almagro và Fransson, *Front.*

Biosci. 13:1619-1633 (2008)); và vùng khung thu được từ việc sàng lọc các thư viện FR (xem, ví dụ, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Các kháng thể người

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất ở đây là kháng thể người. Các kháng thể người có thể được sản sinh bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể người đã được mô tả chung trong van Dijk và van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Các kháng thể người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen mà đã được biến đổi để sản sinh ra các kháng thể người nguyên vẹn hoặc các kháng thể nguyên vẹn có các vùng biến đổi của người đáp ứng với việc thử kháng nguyên. Các động vật này thường chứa toàn bộ hoặc một phần của các locut globulin miễn dịch của người, mà thay thế các locut globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc được tích hợp ngẫu nhiên vào các nhiễm sắc thể của động vật này. Ở chuột chuyển gen như vậy, locut globulin miễn dịch nội sinh thường bị bất hoạt. Để xem lại các phương pháp để thu được các kháng thể người từ động vật chuyển gen, xem Lonberg, *Nat. Biotech* 23:1117-1125 (2005). Cũng xem, ví dụ, Patent Mỹ các số 6,075,181 và 6,150,584 mô tả kỹ thuật XENOMOUSE™; Patent Mỹ số 5,770,429 mô tả kỹ thuật HuMab (nhãn hiệu đã được đăng ký); Patent Mỹ số 7,041,870 mô tả kỹ thuật K-M MOUSE (nhãn hiệu đã được đăng ký), và Công bố đơn Patent Mỹ số US 2007/0061900, mô tả kỹ thuật VelociMouse (nhãn hiệu đã được đăng ký)). Các vùng biến đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi các động vật này có thể được biến đổi thêm, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng hằng định khác của người.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp dựa trên tế bào lai. Các dòng tế bào u tủy người và dòng tế bào u tủy khác loài chuột-người để sản sinh ra các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (xem, ví dụ, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Các kháng thể người

được tạo ra bằng công nghệ lai tế bào B của người cũng được mô tả trong Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp đã được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 7,189,826 (mô tả quy trình sản sinh các kháng thể IgM của người đơn dòng từ dòng tế bào lai) và Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (mô tả các tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai người (Trioma technology) cũng được mô tả trong Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Các kháng thể người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng Fv được chọn từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người. Sau đó, các trình tự miền biến đổi này có thể được kết hợp với miền hằng định mong muốn của người. Các kỹ thuật chọn lọc kháng thể người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Các kháng thể được tạo ra từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp để có được các kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện này để thu được các kháng thể có các đặc điểm liên kết mong muốn. Các phương pháp này được xem lại, ví dụ, trong Hoogenboom et al. trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và được mô tả thêm, ví dụ, trong McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks và Bradbury, trong *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); và Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

Trong một số phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, các nguồn gen VH và VL được tách dòng riêng bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp ngẫu nhiên trong các thư viện thể thực khuẩn, mà sau đó có thể được sàng lọc để thu được các thể thực khuẩn liên kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter

et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Thử thực khuẩn thường thể hiện các đoạn kháng thể, dưới dạng các đoạn chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc dưới dạng các đoạn Fab. Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch tạo ra các kháng thể ái lực cao với kháng nguyên mà không đòi hỏi tạo ra các tế bào lai. Theo cách khác, nguồn tự nhiên có thể được tách dòng (ví dụ, từ người) để cung cấp nguồn kháng thể duy nhất cho nhiều kháng nguyên lạ cũng như kháng nguyên tự thân mà không cần gây miễn dịch bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện tự nhiên cũng có thể được tạo ra theo phương pháp tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V chưa được sắp xếp lại từ các tế bào gốc, và sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa vùng CDR3 biến đổi cao và để hoàn thành việc sắp xếp lại *in vitro*, như được mô tả bởi Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Các công bố sáng chế mô tả các thư viện thử thực khuẩn kháng thể người bao gồm, ví dụ: Patent Mỹ số 5,750,373, và Công bố Patent Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360.

Các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể được phân lập từ các thư viện kháng thể người được xem là kháng thể người hoặc các đoạn kháng thể người ở đây.

Kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất có khối lượng phân tử thấp theo sáng chế có thể được lựa chọn bằng cách thực hiện sàng lọc qua thư viện phân tử liên kết kháng nguyên. Đối với thư viện này, các thư viện kết hợp được mô tả ở trên có thể được sử dụng. Thư viện phân tử liên kết kháng nguyên có thể là nguồn phân tử liên kết kháng nguyên không phân cực (thư viện chưa qua xử lý) hoặc có thể là nguồn phân tử liên kết kháng nguyên phân cực. Các ví dụ về thư viện là nguồn phân tử liên kết kháng nguyên phân cực bao gồm thư viện của phân tử liên kết kháng nguyên mà hoạt tính liên kết đối với hợp chất đặc hiệu được quy định trước đó. Theo phương án nhất định, thư viện phân tử liên kết kháng nguyên là thư viện của phân tử liên kết kháng nguyên mà (các) biến đổi axit amin tạo ra hoạt tính liên kết đối với hợp chất đặc hiệu được đưa vào trước đó. Các ví dụ về loại thư viện này bao gồm các thư viện đã được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn Quốc tế số, WO 2015/083764.

6. Các kháng thể đa đặc hiệu

Theo một vài phương án nhất định, kháng thể được đề xuất ở đây là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng mà có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo một vài phương án nhất định, một trong số tính đặc hiệu liên kết là đối với CD137 và tính đặc hiệu khác là đối với kháng nguyên bất kỳ khác. Theo các phương án nhất định, các kháng thể đặc hiệu kép có thể liên kết với hai epitop khác nhau của CD137. Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để khoanh vùng các chất gây độc tế bào tới các tế bào biểu hiện CD137. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được điều chế dưới dạng các kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc các đoạn kháng thể.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép, một nhánh của chúng có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ và nhánh còn lại của chúng liên kết với kháng nguyên khác CD137. “Kháng nguyên” khác với CD137 không bị giới hạn cụ thể về cấu trúc. Nói cách khác, kháng nguyên này có thể là chất vô cơ hoặc hữu cơ. Các kháng nguyên được lấy làm ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, “IV. Các phương pháp và chế phẩm (phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết với kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ)”, “B. Kháng nguyên”). Theo một phương án, các kháng nguyên này tốt hơn là các kháng nguyên được biểu hiện trong các tế bào ung thư, các tế bào miễn dịch, các tế bào đệm, hoặc các tế bào trong mô ung thư hoặc mô viêm.

Kỹ thuật tạo ra các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (xem Milstein và Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, và Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), và thao tác di truyền “núm-trong-lỗ” (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,731,168). Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách thao tác di truyền các tác động lái tĩnh điện để tạo ra các phân tử heterodime kháng thể Fc (WO 2009/089004A1); liên kết chéo hai hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn (ví dụ, xem Patent Mỹ số 4,676,980, và Brennan et al. 81 (1985)); bằng cách sử dụng khóa kéo leuxin để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); bằng cách sử dụng công nghệ “diabody” để tạo các đoạn kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ,

Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); và sử dụng các dime Fv chuỗi đơn (scFv) (xem, ví dụ Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); và tạo ra các kháng thể đặc hiệu ba như được mô tả, ví dụ, trong Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Các kháng thể được thao tác di truyền với ba vị trí liên kết kháng nguyên chứa năng trở lên, bao gồm “kháng thể bạch tuộc,” cũng được bao gồm ở đây (xem, ví dụ US 2006/0025576A1).

Kháng thể hoặc đoạn ở đây còn bao gồm “Fab hoạt động kép” hoặc “DAF” chứa vị trí liên kết kháng nguyên liên kết với CD137 cũng như một kháng nguyên khác (xem, US 2008/0069820, ví dụ).

7. Biến thể kháng thể

Theo các phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được đề xuất ở đây được dự tính. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa các biến đổi thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể này, hoặc bằng phương pháp tổng hợp peptit. Các biến đổi này bao gồm, ví dụ, các đột biến mất đoạn từ, và/hoặc các đột biến cài xen vào và/hoặc các đột biến thế của các gốc nằm trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của đột biến mất đoạn, đột biến cài xen và đột biến thế có thể được thực hiện để đi đến cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng sở hữu các đặc tính mong muốn, ví dụ, liên kết kháng nguyên.

a) Biến thể thay thế, cài xen và mất đoạn

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều đột biến thế axit amin. Các vị trí cần quan tâm để gây đột biến thế bao gồm các HVR và các FR. Các đột biến thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1 theo tiêu đề "các đột biến thế được ưu tiên." Các thay đổi quan trọng hơn được đưa ra trong Bảng 1 dưới tiêu đề là “các đột biến thế làm ví dụ”, và như được mô tả thêm dưới đây về các lớp chuỗi bên axit amin. Các đột biến thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể cần quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc về hoạt tính mong muốn, ví dụ, giữ được/được cải thiện về khả năng liên kết kháng nguyên, giảm khả năng gây miễn dịch, hoặc cải thiện ADCC hoặc CDC.

Bảng 5

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

Các axit amin có thể được chia nhóm theo các đặc điểm chuỗi bên chung:

- (1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) ưa nước trung tính: Xys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) có tính axit: Asp, Glu;
- (4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các đột biến thể không bảo toàn sẽ dẫn đến việc đổi thành viên của một trong số các lớp này sang một lớp khác.

Một loại biến thể thể bao gồm việc thể một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể gốc (ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể người). Nhìn chung, (các) biến thể thu được được lựa chọn để nghiên cứu thêm sẽ có các biến đổi (ví dụ, cải thiện) về các đặc điểm sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng, khả năng gây miễn dịch giảm) so với kháng thể gốc và/hoặc sẽ có một số đặc điểm sinh học của kháng thể gốc về căn bản được giữ lại. Một biến thể thể làm ví dụ là kháng thể thành thực về ái lực, kháng thể này có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật thành thực ái lực dựa vào sự biểu hiện thể thực khuẩn chẳng hạn như các kỹ thuật được mô tả ở đây. Nói ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc để có hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực liên kết).

Các thay đổi (ví dụ, các đột biến thể) có thể được tạo ra ở các HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực kháng thể. Các thay đổi này có thể được tạo ra trong “các điểm nóng” HVR, nghĩa là, các gốc được mã hóa bởi các codon trải qua đột biến ở tần suất cao trong quá trình trưởng thành soma (xem, ví dụ, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), và/hoặc các gốc tiếp xúc với kháng nguyên, với VH hoặc VL biến đổi thu được được kiểm tra về ái lực liên kết. Sự thuần thực ái lực bằng cách cấu trúc và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, ví dụ, trong Hoogenboom et al. trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) Theo một số phương án về thành thực ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn để làm thành thực bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp khác nhau (ví dụ, PCR dễ bị lỗi, xáo trộn chuỗi, hoặc quá trình gây đột biến định hướng oligonucleotit). Sau đó, thư viện thứ cấp được tạo ra. Sau đó, thư viện này được sàng lọc để nhận diện các biến thể kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để đưa tính đa dạng vào bao gồm các phương pháp định hướng HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lần) được lấy ngẫu nhiên. Các gốc HVR liên quan đến sự liên kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật

gây đột biến quét alanin hoặc tạo mô hình. Cụ thể là, CDR-H3 và CDR-L3 thường được hướng đích.

Theo một số phương án, đột biến thế, đột biến cài xen, hoặc đột biến mất đoạn có thể xảy ra trong một hoặc nhiều HVR miễn là các thay đổi này về căn bản không làm giảm khả năng liên kết với kháng nguyên của kháng thể này. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, các đột biến thế bảo toàn như được đưa ra ở đây) mà về căn bản không làm giảm ái lực liên kết có thể được tạo ra trong các HVR. Ví dụ, các thay đổi này có thể nằm ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong các HVR. Theo các phương án nhất định về các trình tự VH và VL biến đổi được đề xuất trên đây, mỗi HVR không bị thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba đột biến thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được gắn đích để gây đột biến được gọi là “kỹ thuật gây đột biến quét alanin” như được mô tả bởi Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm gồm các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) được nhận diện và được thay thế bằng một axit amin trung tính hoặc axit amin tích điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem sự tương tác của kháng thể này với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các đột biến thế khác có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin thể hiện tính nhạy chức năng với các đột biến thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể được phân tích để nhận diện các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc và các gốc lân cận này có thể được gắn đích hoặc bị loại bỏ dưới dạng ứng viên cho đột biến thế. Các biến thế có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có chứa các đặc điểm mong muốn hay không.

Các đột biến cài xen trình tự axit amin bao gồm các dạng dung hợp tận cùng amino và/hoặc tận cùng carboxyl có độ dài nằm trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc trở lên, cũng như các đột biến cài xen nội trình tự của một gốc axit amin duy nhất hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về các đột biến cài xen tận cùng bao gồm kháng thể có gốc methionyl tận cùng N. Các biến thế cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm dung hợp của enzym (ví dụ đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng thời gian bán thải trong huyết tương của kháng thể đối với tận cùng C hoặc tận cùng N của kháng thể.

b) Các biến thể glycosin hóa

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất ở đây được thay đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ mà kháng thể này được glycosyl hóa. Việc bổ sung hoặc loại bỏ các vị trí glycosyl hóa đối với kháng thể có thể được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ.

Khi kháng thể này chứa vùng Fc, thì cacbonhydrat gắn vào đó có thể được thay đổi. Các kháng thể tự nhiên được sản sinh ra bởi các tế bào động vật có vú thường bao gồm cấu trúc oligosacarit anten kép, có nhánh mà thường được liên kết bởi liên kết N vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem, ví dụ, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Oligosacarit có thể bao gồm nhiều loại cacbonhydrat khác nhau, ví dụ, mannoza, N-acetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn vào GlcNAc trong “thân” của cấu trúc oligosacarit anten kép. Theo một số phương án, các biến đổi của oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra để tạo ra các biến thể kháng thể có các đặc điểm được cải thiện nhất định.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể được đề xuất có cấu trúc cacbonhydrat mà thiếu fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể là từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính toán lượng fucoza trung bình trong chuỗi đường ở Asn297, so với tổng số toàn bộ cấu trúc glyco được gắn vào Asn 297 (ví dụ, cấu trúc phức, lai và mannoza cao) như được đo bằng phương pháp đo phổ khối MALDI-TOF, như được mô tả trong WO 2008/077546, ví dụ. Asn297 được dùng để chỉ gốc asparagin nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (cách đánh số châu Âu đối với các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể nằm ở khoảng +/- 3 axit amin hướng lên hoặc hướng xuống vị trí 297, tức là, nằm trong khoảng các vị trí 294 đến 300, do các thay đổi trình tự nhỏ trong kháng thể. Các biến thể fucosyl hóa này có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Xem, ví dụ, Công bố Patent Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các ví dụ về các công bố liên quan đến các biến thể kháng thể “được khử fucosyl” hoặc “thiếu hụt fucoza” bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US

2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ví dụ về các dòng tế bào có khả năng sản sinh ra các kháng thể được khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu hụt sự fucosyl hóa protein (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, cụ thể ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào bất hoạt (knockout), chẳng hạn như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8*, tế bào CHO knockout (xem, ví dụ, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); và WO2003/085107).

Các biến thể kháng thể còn được đề xuất với oligosacarit chia đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit cấu trúc anten kép gắn vào vùng Fc của kháng thể này bị chia đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể này có thể có mức fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ về các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patent Mỹ số 6,602,684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Các biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc cũng được đề xuất. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều biến đổi axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất ở đây, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc (còn có thể được gọi là “vùng Fc được biến đổi”). Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) chứa biến đổi axit amin (ví dụ đột biến thể) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất biến thể kháng thể có một số nhưng không phải tất cả các chức năng tác động, mà những chức năng này làm cho biến thể đó trở thành ứng viên thích hợp cho các ứng dụng mà trong đó thời gian bán thải của kháng thể này *in vivo* là quan trọng, còn các chức năng tác động nhất

định (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Các thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để xác nhận mức giảm/mức suy yếu của hoạt tính CDC và/hoặc hoạt tính ADCC. Ví dụ, các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể này thiếu khả năng liên kết Fc gamma R (do đó có thể là thiếu hoạt tính ADCC), nhưng giữ được hoạt tính liên kết FcRn. Các tế bào sơ cấp để làm trung gian gây ra ADCC, tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc gamma RIII, trong khi đó bạch cầu đơn nhân biểu hiện Fc gamma RI, Fc gamma RII và Fc gamma RIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo máu được tóm tắt trong bảng 3 trang 464 của Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Các ví dụ không giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm được mô tả trong Patent Mỹ số 5,500,362 (ví dụ, xem Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (xem Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Theo cách khác, phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACT1™ đối với phương pháp đếm tế bào theo dòng (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và CytoTox 96 (nhãn hiệu đã được đăng ký) thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ (Promega, Madison, WI). Các tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như mô hình được mô tả trong Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Các thử nghiệm liên kết C1q cũng có thể được thực hiện để xác nhận rằng kháng thể này không có khả năng liên kết với C1q và do đó thiếu hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, thử nghiệm ELISA liên kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); và Cragg, M.S. và M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Khả năng liên kết FcRn và xác định về độ thanh thải/thời gian bán thải *in vivo* cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết

trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Các kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm các kháng thể có sự thay thế một hoặc nhiều gốc trong số các gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (Patent Mỹ số 6,737,056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc có đột biến thể ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin trong số các vị trí 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm cả cái gọi là thể đột biến Fc “DANA” có thể các gốc 265 và 297 thành alanin (Patent Mỹ số 7,332,581).

Các biến thể kháng thể nhất định với khả năng liên kết tăng hoặc giảm với các FcR được mô tả. (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

Theo một số phương án nhất định, biến thể kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều đột biến thể axit amin mà cải thiện ADCC, ví dụ, các đột biến thể ở các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (cách đánh số châu Âu đối với các gốc).

Theo một số phương án, các thay đổi được tạo ra ở vùng Fc mà dẫn đến khả năng liên kết C1q và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) được thay đổi (tức là, được cải thiện hoặc giảm bớt), ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,194,551, WO 99/51642, và Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Các kháng thể có thời gian bán thải tăng và khả năng liên kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) tăng, mà chịu trách nhiệm về việc chuyển IgG của gốc vào bào thai (Guyer et al. 117:587 (1976) và Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), được mô tả trong US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Các kháng thể đó bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều đột biến thể làm tăng khả năng liên kết vùng Fc vào FcRn. Các biến thể Fc này bao gồm các biến thể có các đột biến thể ở một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, đột biến thể của gốc 434 vùng Fc (Patent Mỹ số 7,371,826).

Cũng xem Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patent Mỹ số 5,648,260; Patent Mỹ số 5,624,821; và WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác về các biến thể vùng Fc.

Theo một phương án, hoạt tính liên kết đối với mỗi thụ thể Fc gamma của người (Fc-gamma R) của vùng Fc kháng thể (bao gồm vùng Fc biến đổi (áp dụng tương tự sau đây)) có thể được đo bằng phương pháp bắt giữ phối tử bằng cách sử dụng, ví dụ, BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200, dựa trên phương pháp phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt làm nguyên tắc đo.

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với các thụ thể Fc gamma khác nhau của người (Fc-gamma Rs) được lấy làm ví dụ được mô tả dưới đây. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với Fc-gamma R được đánh giá bằng cách sử dụng BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200. Theo phương án được ưu tiên, phép đo này được thực hiện ở 25 độ C, sử dụng hệ đệm đo 50 mM phosphat, 150 mM NaCl, 0,05% khối lượng/thể tích-P20, pH 7,4. Cụ thể là, khoảng 1000 RU kháng thể chứa vùng Fc biến đổi đầu tiên được bắt giữ trên chip cảm biến, với thể tiếp hợp Biotin động học Fab-lambda của người CaptureSelect (nhãn hiệu) (ThermoFisher scientific) được cố định làm phân tử bắt giữ phối tử. Các Fc-gamma R của người được pha loãng bằng hệ đệm đo đến 8 nM đối với Fc-gamma RIa và đến 1000 nM đối với các Fc-gamma R khác, và được cho phép liên kết với kháng thể bị bắt giữ. Hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể đối với mỗi Fc-gamma R được đánh giá bằng cách tính lượng Fc-gamma R được liên kết trên mỗi lượng đơn vị kháng thể (RU) bằng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với các thụ thể Fc gamma của người (Fc-gamma R) khác nhau có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 7-4.

Theo một phương án được ưu tiên, Fc-gamma R được sử dụng cho phương pháp đo được mô tả ở trên có thể là miền ngoại bào của Fc-gamma R được điều chế bằng phương pháp được mô tả dưới đây. Đầu tiên, quá trình tổng hợp gen miền ngoại bào của Fc-gamma R được thực hiện bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Đối với quá trình tổng hợp này, các trình tự của mỗi Fc-gamma R được điều chế dựa trên thông tin được đăng ký tại NCBI. Cụ thể hơn, trình tự đối với Fc-gamma RI được điều chế dựa trên trình tự đăng ký NCBI # NM_000566.3, trình tự đối với Fc-gamma RIa được điều chế dựa trên trình tự đăng ký NCBI # NM_001136219.1, trình tự đối với Fc-gamma RIb được điều chế dựa trên trình tự đăng ký NCBI # NM_004001.3, và trình tự đối với Fc-gamma RIIIa được điều chế dựa trên trình tự đăng ký NCBI # NM_001127593.1,

và đuôi His được bổ sung vào tận cùng C. Các vị trí đa hình đối với Fc-gamma RIIa được chuẩn bị bằng cách tham chiếu tới J. Exp. Med., 1990, 172, 19-25, và các vị trí đa hình đối với Fc-gamma RIIIa được chuẩn bị bằng cách tham chiếu tới J. Clin. Invest., 1997, 100, 1059-1070. Các đoạn gen thu được được cài xen vào vector biểu hiện cho các tế bào động vật để điều chế các vector biểu hiện. Các vector biểu hiện được điều chế được đưa tạm thời vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) có nguồn gốc từ các tế bào ung thư phôi thận của người và protein quan tâm được cho phép để biểu hiện. Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập và lọc qua màng lọc 0,22 micromet, và sau đó được tinh chế cơ bản qua bốn bước được mô tả sau đây. Bước thứ nhất, sắc ký cột trao đổi cation (SP Sepharose FF) được thực hiện; bước thứ hai, sắc ký cột ái lực đối với đuôi His (HisTrap HP); bước thứ ba, sắc ký cột lọc gel (Superdex200); và bước thứ tư, lọc vô trùng. Lưu ý rằng đối với Fc-gamma RI, sắc ký cột trao đổi anion sử dụng Q sepharose FF được thực hiện như bước thứ nhất. Nồng độ của protein được tinh chế được tính toán dựa trên hệ số hấp thụ, được tính toán bằng cách đo độ hấp thụ ở 280 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế và sử dụng PACE hoặc phương pháp tương tự đối với các giá trị đo (Protein Science, 1995, 4, 2411-2423).

Theo một phương án, hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với FcRn của người có thể được đo bằng phương pháp bắt giữ phôi tử bằng cách sử dụng, ví dụ, BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200, dựa trên phương pháp phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt làm nguyên tắc đo.

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với FcRn của người được lấy làm ví dụ được mô tả dưới đây. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với FcRn của người được đánh giá bằng cách sử dụng BIACORE (nhãn hiệu đã được đăng ký) T200. Theo phương án được ưu tiên, phép đo này được thực hiện ở 25 độ C, sử dụng hệ đệm đo 50 mM phosphat, 150 mM NaCl, 0,05% khối lượng/thể tích-P20, pH 6,0. Cụ thể là, khoảng 400 RU kháng thể chứa vùng Fc đầu tiên được bắt giữ trên chip cảm biến, trên đó thể tiếp hợp biotin động học Fab-lambda của người CaptureSelect (nhãn hiệu) (ThermoFisher scientific) được cố định làm phân tử bắt giữ phôi tử, và sau đó FcRn của người được pha loãng bằng cách sử dụng hệ đệm đo được cho phép để liên kết vào đó. Hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể đối với FcRn được đánh giá bằng cách tính KD (M) sử dụng mô hình trạng thái ổn định trong phần mềm đánh giá Biacore

T200 2.0. Theo một phương án được ưu tiên, protein FcRn của người được sử dụng trong phép đo này được điều chế theo phương pháp được mô tả trong ví dụ tham chiếu 2 của WO2010107110. Theo một phương án, hoạt tính liên kết của vùng Fc kháng thể đối với FcRn của người khác nhau có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 7-5.

d) Các biến thể kháng thể được thao tác di truyền xystein

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn tạo ra các kháng thể được thao tác di truyền xystein, ví dụ, “thioMAb”, mà trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế bằng các gốc xystein. Trong các phương án cụ thể, các gốc được thế xuất hiện ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Bằng cách biến đổi các gốc đó bằng xystein, các nhóm thiol phản ứng nhờ đó được đặt ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể với các gốc khác, như các gốc được chất hoặc các gốc liên kết-được chất, để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch, như được mô tả thêm ở đây. Theo một số phương án nhất định, bất kỳ một hoặc nhiều gốc trong các gốc sau đây có thể được thế bằng xystein: V205 (cách đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (cách đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (cách đánh số EU) của vùng Fc chuỗi nặng. Các kháng thể xystein được thao tác di truyền có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 7,521,541.

e) Các dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất ở đây có thể được biến đổi thêm để chứa các gốc không phải protein bổ sung mà đã được biết trong lĩnh vực này và dễ tìm. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các polyme tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme của etylen/anhydrit maleic, axit polyamin (hoặc homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, homopolyme của polypropylen glycol, co-polyme của polypropylen oxit/etylen oxit, polyol được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có nhiều ưu điểm trong quá trình

sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme này có thể có khối lượng phân tử bất kỳ, và có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số polyme được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, thì chúng có thể là cùng một phân tử hoặc các phân tử khác nhau. Nhìn chung, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa vào sự cân nhắc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, xem dẫn xuất kháng thể có được sử dụng trong liệu pháp trong các điều kiện xác định hay không, v.v.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các thể tiếp hợp của kháng thể và gốc không phải protein mà có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách tiếp xúc với bức xạ được đề xuất. Theo một phương án, gốc không phải protein là ống nano cacbon (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bước sóng mà không gây hại cho các tế bào thông thường, nhưng gia nhiệt gốc không phải protein này đến một nhiệt độ mà tại đó các tế bào gần với kháng thể-gốc không phải protein bị tiêu diệt.

B. Các chế phẩm và các phương pháp tái tổ hợp

Các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các chế phẩm và phương pháp tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,816,567. Theo một phương án được đề xuất, axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được mô tả ở đây. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể này). Theo một phương án khác nữa, một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện) bao gồm axit nucleic này được đề xuất. Theo một phương án khác nữa, tế bào chủ chứa axit nucleic này được đề xuất. Theo một phương án như vậy, tế bào chủ chứa (ví dụ, đã được biến nạp bằng): (1) vector chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, hoặc (2) vector thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vector thứ hai chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ này là tế bào nhân chuẩn, ví dụ tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp2). Theo một

phương án, phương pháp tạo ra kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể này, như được đề xuất trên đây, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 này, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Đối với việc sản xuất tái tổ hợp kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và được cài vào một hoặc nhiều vector để tách dòng thêm và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Axit nucleic này có thể dễ dàng được phân lập và được giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện các vector mã hóa kháng thể bao gồm các tế bào nhân nguyên thủy hoặc nhân chuẩn được mô tả ở đây. Ví dụ, các kháng thể có thể được tạo ra trong vi khuẩn, cụ thể là khi sự glycosyl hóa và chức năng tác động Fc là không cần thiết. Đối với biểu hiện của các đoạn kháng thể và các polypeptit trong vi khuẩn, xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,648,237, 5,789,199, và 5,840,523. (Cũng xem Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), trang 245-254, mô tả biểu hiện của các đoạn kháng thể ở *E. coli*.) Sau khi biểu hiện, kháng thể này có thể được phân lập từ bọt nhão chứa tế bào vi khuẩn trong phân đoạn hòa tan và có thể được tinh chế thêm.

Ngoài ra các vi sinh vật nhân nguyên thủy, các vi sinh vật nhân chuẩn như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho các vector mã hóa kháng thể, bao gồm cả các chủng nấm và nấm men mà có các con đường glycosyl hóa đã được “được làm tương thích với người”, dẫn đến sự sản sinh kháng thể có kiểu glycosyl hóa của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), và Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng thu được từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về các tế bào của động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut khác nhau đã được nhận diện mà

có thể được sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm các vật chủ. Ví dụ, xem các Patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể ở các loài thực vật chuyển gen).

Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú mà được làm cho thích hợp để sinh trưởng trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng tế bào phôi thận của người (293 hoặc tế bào 293 như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59, (1977); các tế bào thận chuột túi má sơ sinh (BHK); các tế bào Sertoli của chuột (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, (1980)); các tế bào thận của khỉ (CV1); các tế bào thận của khỉ xanh ở Châu Phi (VERO-76); các tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA); các tế bào thận của chó (MDCK; các tế bào gan của chuột buffalo (BRL 3A); các tế bào phổi của người (W138); các tế bào gan của người (Hep G2); khối u vú của chuột (MMT 060562); các tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích khác bao gồm các tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO), bao gồm các tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để xem lại một số dòng tế bào chủ của động vật có vú thích hợp để sản xuất kháng thể, ví dụ, xem Yazaki và Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Các thử nghiệm

Các kháng thể hoặc phân tử liên kết nguyên kháng CD137 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được nhận diện, được sàng lọc, hoặc được xác định đặc điểm về các thuộc tính vật lý/hóa học và/hoặc các hoạt tính sinh học của chúng bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

1. Các thử nghiệm về khả năng liên kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được thử nghiệm đối với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết chẳng hạn như ELISA, Western blot, v.v.

Theo một khía cạnh khác, thử nghiệm cạnh tranh khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ có thể được sử dụng để xác định kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên mà cạnh tranh để liên kết với CD137 với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, và/hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 ở dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp (ví dụ, khi có mặt 10 micromol trở lên, 50 micromol trở lên, 100 micromol trở lên, 150 micromol trở lên, 200 micromol trở lên, hoặc 250 micromol trở lên hợp chất có khối lượng phân tử thấp). Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên cạnh tranh này liên kết với cùng một epitop (ví dụ, epitop tuyến tính hoặc epitop cấu trúc) mà được liên kết bởi các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 chứa A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, và/hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 ở dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Phương pháp làm ví dụ được mô tả chi tiết để lập bản đồ epitop mà kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết vào được đề xuất trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," trong *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ nhận biết epitop được tạo thành bởi phức hợp được tạo thành từ kháng nguyên (ví dụ, CD137) và hợp chất có khối lượng phân tử thấp (ví dụ, ATP).

Trong thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ sử dụng kháng thể, CD137 bất động được ủ khi có mặt hợp chất có khối lượng phân tử thấp (ví dụ, khi có mặt 10 micromol trở lên, 50 micromol trở lên, 100 micromol trở lên, 150 micromol trở lên, 200 micromol trở lên, hoặc 250 micromol trở lên hợp chất có khối lượng phân tử thấp) trong dung dịch chứa kháng thể được gắn nhãn thứ nhất liên kết với CD137

(ví dụ, kháng thể kháng CD137 chứa A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256, và/hoặc A549/B167 được mô tả trong Bảng 17 ở dạng tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ) và kháng thể không được gắn nhãn thứ hai mà được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh để liên kết với CD137 so với kháng thể thứ nhất. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi bề mặt tế bào lai chứa tế bào lai. Đối với mẫu đối chứng, CD137 bất động được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không chứa kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép liên kết kháng thể thứ nhất vào CD137, lượng dư kháng thể không được liên kết được loại bỏ, và đo lượng chất đánh dấu gắn liền với CD137 đã được làm bất động. Nếu lượng chất đánh dấu gắn với CD137 đã được làm bất động về căn bản giảm đi trong mẫu thử so với mẫu đối chứng, thì cho thấy kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết với CD137. Xem Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng thử nghiệm này có thể được thực hiện tương tự với các phân tử liên kết kháng nguyên không phải kháng thể.

2. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được đề xuất để xác định hoạt tính sinh học của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, hoạt tính chủ vận CD137; thời gian bán thải trong huyết tương; hoạt tính kháng u; và phản ứng toàn thân thấp hoặc bị ức chế ở các mô không phải khối u. Các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính sinh học *in vivo* và/hoặc *in vitro* như vậy cũng được đề xuất.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên (ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137) theo sáng chế được thử nghiệm đối với hoạt tính sinh học như vậy.

a) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (PBMC)

Theo một phương án, hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đo bằng cách cho các tế bào biểu hiện CD137 tiếp xúc với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng

nguyên kháng CD137 trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung hoặc không được bổ sung vào. Theo một phương án, hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung, và hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ không được bổ sung, lần lượt được đánh giá bằng lượng sản sinh xytokin (ví dụ, lượng sản sinh IL-2, IFN- γ , và/hoặc IL-6) được đo trong 18 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, hoặc 72 giờ sau khi tế bào biểu hiện CD137 và kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên CD137 được tiếp xúc với nhau trong dung dịch. Theo một phương án, dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung được điều chỉnh sao cho nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ sau khi điều chỉnh là 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M. Theo phương án khác, các tế bào biểu hiện CD137 được sử dụng là các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập, hoặc các tế bào T được khuếch đại từ PBMC của người được phân lập.

Theo một phương án, PBMC của người được phân lập từ máu thu được từ các cá thể khỏe mạnh bằng cách ly tâm ở 400 x g trong 30 phút ở nhiệt độ phòng được sử dụng. Tốt hơn là, PBMC của người được phân lập theo hai bước sau đây được sử dụng. Ở bước thứ nhất, Leucosep (Greiner Bio-One) được bổ sung Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) được ly tâm ở 1000 x g trong 1 phút ở nhiệt độ phòng, và sau đó máu được pha loãng với PBS được bổ sung, và ly tâm ở 400 x g trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Ở bước thứ hai, sau khi thu được lớp màng đệm từ ống sau khi ly tâm, nó được rửa bằng 60 mL PBS (Wako).

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng PBMC của người làm ví dụ được mô tả dưới đây. Lưu ý rằng mặc dù ví dụ dưới đây sử dụng ATP dưới dạng hợp chất phân tử nhỏ để minh họa, nhưng điều này không loại trừ các hợp chất phân tử nhỏ khác. Theo một phương án, PBMC của người được phân lập được pha loãng đến mật độ tế bào 5×10^6 /mL bằng môi trường nuôi cấy (5% huyết thanh người (SIGMA), 95% AIM-V (Thermo Fischer Scientific)). Sau đó, PBMC của người được phân lập được tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người, nhờ đó sự biểu hiện CD137 được gây ra trong PBMC của người. Tốt hơn là, 50 μ L kháng thể kháng CD3 ϵ người 0,04 μ g/mL (BD Co., dòng vô tính SP34) và kháng thể kháng CD28 người 20 μ g/mL (BD, dòng vô tính: CD28.2) được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy được bổ sung vào PBMC của người được phân lập (100 μ L ở mật độ tế bào 5×10^6 /mL).

PBMC của người mà kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người được bổ sung vào, sau đó được bổ sung thêm (i) môi trường nuôi cấy có hoặc không có ATP; và (ii) kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137. Tốt hơn là, 25 μ L môi trường nuôi cấy có hoặc không có ATP, được bổ sung. Tốt hơn là, 25 μ L kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 ở nồng độ 40 μ g/mL được bổ sung. Tốt hơn nữa là, (i) và (ii) nêu trên được bổ sung vào khoảng 6 giờ sau khi cho PBMC của người tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người. Theo một phương án, tốt hơn là, lượng sản sinh IL-2 được đo trước lượng sản sinh IFN- γ . Theo một phương án, lượng sản sinh IL-2 được đo trong khoảng 24 giờ sau khi cho PBMC của người tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người. Tốt hơn là, lượng sản sinh IL-2 được đo khoảng 24 giờ sau khi cho PBMC của người tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người, và khoảng 18 giờ sau khi bổ sung kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

Theo phương án khác, lượng sản sinh IFN- γ được đo trong khoảng 48 giờ sau khi cho PBMC của người tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người. Tốt hơn là, lượng sản sinh IFN- γ được đo khoảng 48 giờ sau khi cho PBMC của người tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người, và khoảng 42 giờ sau khi bổ sung kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137. Theo một phương án, lượng sản sinh IL-2 và/hoặc lượng sản sinh IFN- γ được xác định bằng cách đo lượng sản sinh IL-2 và/hoặc lượng sản sinh IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được. Theo một phương án, PBMC của người được bổ sung kháng thể kháng CD3 ϵ người và/hoặc kháng thể kháng CD28 người được để yên trong thiết bị ủ 5% CO₂ ở 37°C cho tới khi tất cả các phép đo được hoàn thành.

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng PBMC của người làm ví dụ được mô tả dưới đây. PBMC của người được phân lập được pha loãng đến mật độ tế bào 5 x 10⁶/mL bằng môi trường nuôi cấy (5% huyết thanh người (SIGMA), 95% AIM-V (Thermo Fischer Scientific)). Sau đó, PBMC của người được điều chỉnh đến mật độ tế bào là 5 x 10⁶/mL, và 100 μ L mỗi PBMC này được gieo vào đĩa đa giếng 96 giếng (đáy phẳng, có nắp) (Corning). Sau đó, PBMC của người được đưa vào hoạt động để gây ra sự biểu hiện CD137. Ví dụ, sự biểu

hiện CD137 ở PBMC của người được gây ra bằng cách bổ sung 50 μL kháng thể kháng CD3 ϵ người 0,04 $\mu\text{g/mL}$ (BD Co., dòng vô tính SP34) và kháng thể kháng CD28 người 20 $\mu\text{g/mL}$ (BD, dòng vô tính: CD28.2) được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy.

Sau khi gây ra biểu hiện CD137 trong PBMC của người, đĩa được lắc và để yên trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Sau đó, 25 μL mỗi ATP (SIGMA) 2 mM được pha loãng bằng môi trường hoặc môi trường chỉ không có ATP, và 25 μL mỗi kháng thể ở nồng độ 40 $\mu\text{g/mL}$ được bổ sung vào mỗi giếng, và sau đó đĩa được lắc và để yên trong 18 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Sau đó, một phần chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập, và sử dụng, lượng IL-2 có trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) của người hoặc bộ IL-2 ELISA (BD Biosciences) của người. Sau khi thu thập chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy, đĩa lại được để yên trong 24 giờ ở 37°C một lần nữa trong thiết bị ủ 5% CO₂. Sau đó, một phần chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập, và sử dụng, lượng IFN- γ có trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit IFN- γ DuoSet ELISA (R&D systems) của người hoặc bộ kit IFN- γ ELISA Development (PeproTech) của người. ELISA được thực hiện cơ bản theo quy trình đi kèm theo bộ kit. Đối với bộ kit IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) của người và bộ kit IFN- γ DuoSet ELISA (R&D systems) của người, quá trình hiện màu và mất màu được thực hiện theo quy trình sử dụng dung dịch chất nền (R&D systems) chứa H₂O₂ và tetramethylbenzidin và 1N H₂SO₄ (Wako). Đối với bộ IL-2 ELISA (BD Biosciences) của người, sự mất màu được thực hiện bằng cách sử dụng 1N H₂SO₄ (Wako).

Đối với bộ kit IFN- γ ELISA Development (PeproTech), quá trình hiện màu và quá trình mất màu được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch nhuộm sắc thể TMB (Thermo Fischer Scientific) và 1N H₂SO₄ (Wako). Sau đó, phép đo độ hấp thụ được thực hiện bằng EnVision (PerkinElmer), và lượng (pg/mL) IL-2 và IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy lần lượt được tính toán bằng cách sử dụng đường cong chuẩn được chuẩn bị theo quy trình. Trong thử nghiệm PBMC, hoạt tính chủ vận CD137 có thể được biểu hiện ở dạng số lần thay đổi của lượng IL-2 và IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy so với hoạt tính chủ vận của kháng thể đối chứng âm (kháng thể không liên kết với CD137). Theo một phương

án, hoạt tính chủ vận CD137 được đo theo phương pháp được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng lượng sản sinh xytokin (ví dụ, lượng sản sinh IL-2, IFN- γ , và/hoặc IL-6) trong thử nghiệm PBMC của người, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được đánh giá là bậc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 có mặt hợp chất phân tử nhỏ nếu lượng sản sinh xytokin có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được bổ sung là 1,01 lần trở lên, 1,02 lần trở lên, 1,03 lần trở lên, 1,05 lần trở lên, 1,06 lần trở lên, 1,07 lần trở lên, 1,08 lần trở lên, 1,09 lần trở lên, 1,1 lần trở lên, 1,11 lần trở lên, 1,12 lần trở lên, 1,13 lần trở lên, 1,14 lần trở lên, hoặc 1,15 lần trở lên, 1,5 lần trở lên, 2 lần trở lên, hoặc 3 lần trở lên, so với lượng sản sinh xytokin khi kháng thể đối chứng âm được bổ sung.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bởi lượng sản sinh IL-2 trong thử nghiệm PBMC của người, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được đánh giá là bậc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 có mặt hợp chất phân tử nhỏ nếu lượng sản sinh IL-2 khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được bổ sung là 1,01 lần trở lên, 1,02 lần trở lên, 1,03 lần trở lên, hoặc 1,05 lần trở lên, và là 1,05 lần trở lên theo phương án được ưu tiên, so với lượng sản sinh IL-2 khi kháng thể đối chứng âm được bổ sung.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bởi lượng sản sinh IFN- γ trong thử nghiệm PBMC của người, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được đánh giá là bậc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 có mặt hợp chất phân tử nhỏ nếu lượng sản sinh IFN- γ khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M của hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được bổ sung là 1,1 lần trở lên, 1,11 lần trở lên, 1,12 lần trở lên, 1,13 lần trở lên, 1,14 lần trở lên, hoặc 1,15 lần trở lên, và là 1,15 lần trở lên theo phương án được ưu tiên, so với lượng sản sinh IFN- γ khi kháng thể đối chứng âm được bổ sung.

Theo phương án khác, từ trong số các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 có mặt hợp chất phân tử nhỏ khi so sánh với kháng thể đối chứng âm được đề cập đến ở trên, các kháng thể được đánh giá là không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 hoặc có hoạt tính chủ vận CD137 thấp hơn khi không có hợp chất phân tử nhỏ (so với hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ) được xác định thêm. Cụ thể là, khi giá trị (ii) lớn hơn (i) dưới đây, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh giá là không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 hoặc có hoạt tính chủ vận CD137 thấp hơn khi không có hợp chất phân tử nhỏ:

(i) [lượng sản sinh xytokin không có hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được bổ sung]/ [lượng sản sinh xytokin khi không có hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể đối chứng âm được bổ sung]

(ii) [lượng sản sinh xytokin có mặt hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được bổ sung] / [lượng sản sinh xytokin có mặt hợp chất phân tử nhỏ khi kháng thể đối chứng âm được bổ sung]

Theo phương án khác, khi hoạt tính chủ vận CD137 của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất và kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai được so sánh bằng lượng sản sinh xytokin (ví dụ, lượng sản sinh IL-2, IFN- γ , và/hoặc IL-6) trong thử nghiệm PBMC của người, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất có thể được đánh giá là có hoạt tính chủ vận cao hơn kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai nếu (i) lượng sản sinh xytokin khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất được bổ sung khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ là 1,01 lần trở lên, 1,02 lần trở lên, 1,03 lần trở lên, 1,04 lần trở lên, 1,05 lần trở lên, 1,06 lần trở lên, 1,07 lần trở lên, 1,08 lần trở lên, 1,09 lần trở lên, 1,1 lần trở lên, 1,11 lần trở lên, 1,12 lần trở lên, 1,13 lần trở lên, 1,14 lần trở lên, hoặc 1,15 lần trở lên, 1,5 lần trở lên, 2 lần trở lên, hoặc 3 lần trở lên, so với (ii) lượng sản sinh xytokin khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai được bổ sung ở các điều kiện giống nhau.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng lượng sản sinh IL-2 trong thử nghiệm PBMC của người, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất có thể được đánh giá là có hoạt tính chủ vận cao hơn kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai nếu (i) lượng sản sinh xytokin khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất được bổ sung khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ là 1,01 lần trở lên, 1,02 lần trở lên, 1,03 lần trở lên, hoặc 1,04 lần trở lên, hoặc là 1,04 lần trở lên theo phương án ưu tiên, so với (ii) lượng sản sinh IL-2 khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai này được bổ sung ở các điều kiện giống nhau.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng lượng sản sinh IFN- γ trong thử nghiệm PBMC của người, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất có thể được đánh giá là có hoạt tính chủ vận cao hơn kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai nếu (i) lượng sản sinh xytokin khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất được bổ sung khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ là 1,05 lần trở lên, 1,06 lần trở lên, 1,07 lần trở lên, 1,08 lần trở lên, 1,09 lần trở lên, hoặc 1,1 lần trở lên, hoặc 1,1 lần trở lên theo phương án ưu tiên, so với (ii) khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai được bổ sung ở các điều kiện giống nhau. Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ nhất là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng Fc gốc, và phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thứ hai là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng Fc biến đổi.

Theo một phương án, phương pháp được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2 có thể được sử dụng để đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng PBMC của người, và phương pháp được mô tả trong ví dụ 2-6 có thể được sử dụng để đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng các tế bào T khuếch đại từ PBMC của người được phân lập.

Theo một phương án, hoạt tính chủ vận đối với CD137 có thể được đo bằng cách cho các tế bào T dương tính với CD4 và các tế bào T dương tính với CD8 được phân lập từ PBMC của người tiếp xúc với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, trong dung dịch mà hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung hoặc không được bổ sung vào. Tại thời điểm này, các tế bào biểu hiện Fc γ RIIb

có thể được bổ sung thêm vào dung dịch. Theo cách khác, hoạt tính chủ vận đối với CD137 có thể được đo bằng cách cho tế bào B (mà có thể được phân lập từ PBMC của người, hoặc dòng tế bào B đã biết có thể được sử dụng) tiếp xúc với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137. Theo một phương án, hoạt tính chủ vận đối với CD137 có thể được đánh giá bởi lượng sản sinh xytokin (ví dụ, lượng sản sinh IL-2, IFN- γ và/hoặc lượng IL-6) được đo trong dung dịch, sau khi cho các tế bào T dương tính với CD8, các tế bào T dương tính với CD4, hoặc tế bào B tiếp xúc với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

Theo một phương án, các thử nghiệm hoạt tính chủ vận sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người (PBMC) được phân lập từ máu thu được từ các cá thể khỏe mạnh. Do đó, theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các kết quả thử nghiệm sử dụng các thử nghiệm này có thể khác nhau tùy theo mỗi mẫu máu của người cho. Xem xét điểm này, các kháng thể có hoạt tính chủ vận CD137 không được bộc lộ cho một phần hoặc phần lớn PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho có thể không được đánh giá để bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137, dù là tiêu chuẩn đối với hoạt tính chủ vận đã đáp ứng ở phần khác của PBMC của người. Ngoài ra, khi thử nghiệm theo phương pháp được mô tả ở trên được thực hiện trên PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho và tiêu chuẩn đối với hoạt tính chủ vận CD137 đáp ứng ở phần lớn người cho, nó có thể được đánh giá rằng hoạt tính chủ vận CD137 được bộc lộ. Theo cách khác, khi thử nghiệm theo phương pháp được mô tả ở trên được thực hiện trên PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho, các giá trị thử nghiệm trung bình (ví dụ, lượng sản sinh IL-2, IFN- γ , và/hoặc IL-6) có thể được sử dụng để xác định xem có hay không có hoạt tính chủ vận CD137. Theo một phương án, khi thử nghiệm được thực hiện theo phương pháp nêu trên đối với PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho, số lượng người cho là, ví dụ, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn, 5 hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 15 hoặc nhiều hơn, hoặc 20 hoặc nhiều hơn.

b) Thử nghiệm hoạt tính chủ vận (thử nghiệm gen chỉ thị)

Theo một phương án, hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị trong dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung, hoặc không được bổ sung. Theo một phương án, hoạt tính chủ vận đối với CD137 trong dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung, và hoạt tính chủ vận

đối với CD137 trong dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ không được bổ sung, lần lượt được đánh giá bằng tín hiệu phát quang luciferaza đo được sau khi cho các tế bào T biểu hiện cấu trúc chỉ thị NF-kappaB-luciferaza và CD137 tiếp xúc với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, và để yên trong khoảng thời gian nhất định, trong dung dịch tương ứng. Theo một phương án, dung dịch trong đó hợp chất phân tử nhỏ được bổ sung được điều chỉnh sao cho nồng độ hợp chất phân tử nhỏ sau khi điều chỉnh là 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M. Các tế bào T biểu hiện cấu trúc chỉ thị NF-kappaB-luciferaza và CD137 tốt hơn là, dòng tế bào GloResponseTM NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004).

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị được mô tả dưới đây. Trong các ví dụ sau, ATP được sử dụng làm ví dụ về hợp chất phân tử nhỏ, nhưng không bao gồm các hợp chất phân tử nhỏ khác. Theo một phương án, đầu tiên, các tế bào biểu hiện Fc γ RIIb được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^4 /mL bằng môi trường (môi trường nuôi cấy CHO (90% Ham's F12, 10% FBS)), và để yên qua đêm ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Theo một phương án, đối với các tế bào biểu hiện Fc γ RIIb, không chỉ các tế bào buộc phải biểu hiện Fc γ RIIb, mà còn các dòng tế bào biểu hiện Fc γ RIIb nội sinh, chẳng hạn như dòng tế bào B, tế bào B được phân lập từ cơ thể sống, hoặc tương tự có thể được sử dụng. Theo phương án được ưu tiên, các tế bào biểu hiện Fc γ RIIb là tế bào Fc γ RIIb CHO-K1 (Promega). Tiếp theo, sau khi loại bỏ môi trường bằng cách hút, dòng tế bào GloResponseTM NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat (sau đây gọi là, “4-1BB Jurkat”) được điều chỉnh tới 2×10^6 /mL bằng môi trường khác (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung. Theo phương án được ưu tiên, mỗi 200 μ L tế bào biểu hiện Fc γ RIIb được điều chỉnh bằng môi trường, 25 μ L dòng tế bào GloResponseTM NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chỉnh bằng môi trường được bổ sung. Sau đó, mỗi 25 μ L phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được pha loãng bằng môi trường nêu trên (99% RPMI, 1% FBS) để đạt nồng độ mong muốn (ví dụ, nồng độ cuối cùng là 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 μ g/mL) được bổ sung, và 25 μ L dung dịch ATP cũng được pha loãng bằng môi trường nêu trên (99% RPMI, 1% FBS) để đạt nồng độ mong muốn (ví dụ, nồng độ cuối cùng là 0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 μ M) được bổ sung. Theo một phương án, tín hiệu phát quang luciferaza được đo sau khi để yên trong 2 giờ hoặc ngắn hơn, 4 giờ hoặc ngắn hơn, 6 giờ hoặc ngắn hơn, 24 giờ hoặc ngắn hơn, sau khi bổ sung phân tử liên kết kháng nguyên kháng

CD137 vào 4-1BB Jurkat. Theo phương án được ưu tiên, 4-1BB Jurkat được để yên ở 37°C trong 6 giờ trong thiết bị ủ 5% CO₂. Sau khi để yên, bổ sung 75 µL thuốc thử Bio-Glo, và độ phát quang được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Theo một phương án được ưu tiên, thuốc thử Bio-Glo này là hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (hệ đệm và chất nền). Theo một phương án, để giữ cho nhiệt độ trong quá trình phản ứng không đổi, 4-1BB Jurkat có thể được để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, 10 phút, 15 phút, hoặc 20 phút sau khi được lấy ra khỏi thiết bị ủ. Theo phương án ưu tiên, 4-1BB Jurkat được để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút sau khi được lấy ra khỏi thiết bị ủ. Theo một phương án, giá trị phát quang của 4-1BB Jurkat được bổ sung phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được chia cho giá trị phát quang của 4-1BB Jurkat không được bổ sung phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, và giá trị này được lấy dưới dạng số lần cảm ứng (đơn vị sáng tương đối) và được sử dụng làm chỉ số để đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 của mỗi phân tử liên kết kháng nguyên.

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị được mô tả dưới đây. Mỗi 200 µL tế bào FcγRIIB CHO-K1 (Promega) được điều chỉnh tới nồng độ 5×10^4 /mL bằng môi trường được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, và để yên qua đêm ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Đối với môi trường nuôi cấy, môi trường nuôi cấy CHO (90% Ham's F12, 10% FBS) được sử dụng. Sau đó, sau khi loại bỏ hoàn toàn môi trường bằng cách hút, 25 µL dòng tế bào GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chỉnh tới nồng độ 2×10^6 /mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Sau đó, mỗi 25 µL của mỗi dung dịch kháng nguyên được pha loãng bằng môi trường thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, hoặc 10 µg/mL được bổ sung, và cuối cùng, bổ sung 25 µL dung dịch ATP được pha loãng bằng môi trường thử nghiệm tới nồng độ là 0 hoặc 250 µM. Sau khi để yên đĩa trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂, đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và bổ sung 75 µL thuốc thử Bio-Glo vào mỗi giếng. Đối với thuốc thử Bio-Glo, ví dụ, hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (hệ đệm và chất nền) có thể được sử dụng. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Giá trị thu được bằng cách chia giá trị phát quang của mỗi giếng cho giá trị phát quang của giếng không được bổ sung kháng thể bất kỳ được xác định bằng số lần cảm ứng. Trong thử nghiệm gen chỉ thị, hoạt tính chủ vận CD137 có thể được đánh

giá bằng số lần thay đổi (đơn vị sáng tương đối) của độ phát quang của các giếng được bổ sung mỗi kháng thể kháng lại lượng phát quang của giếng không được bổ sung kháng thể bất kỳ.

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị được mô tả dưới đây. Bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 384 giếng 10 μL tế bào Fc γ RIIB CHO-K1 (Promega) được điều chỉnh tới nồng độ $2 \times 10^6/\text{mL}$ bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS). Sau đó, 10 μL dung dịch kháng thể chứa ADP, hoặc dung dịch kháng thể chứa ATP, hoặc dung dịch kháng thể không chứa ATP hoặc ADP, được bổ sung vào mỗi giếng. 10 μL dòng tế bào GloResponseTM NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chỉnh tới nồng độ $2 \times 10^6/\text{mL}$ bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) sau đó được thêm vào mỗi giếng. Nồng độ cuối cùng của ADP là 50 μM và nồng độ cuối cùng của ATP là 50 μM . Sau khi để yên đĩa trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂, đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và bổ sung 30 μL thuốc thử Bio-Glo vào mỗi giếng. Đối với thuốc thử Bio-Glo, hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (hệ đệm và chất nền) được sử dụng. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Hoạt tính chủ vận CD137 có thể được đánh giá bằng đơn vị sáng tương đối (còn được gọi là số lần phát quang hoặc số lần thay đổi) của độ phát quang của các giếng được bổ sung mỗi kháng thể kháng lại độ phát quang của các giếng không được bổ sung kháng thể bất kỳ.

Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị được mô tả dưới đây. Bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 384 giếng 10 μL tế bào Fc γ RIIB CHO-K1 (Promega) được điều chỉnh tới nồng độ $4 \times 10^5/\text{mL}$ bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS). Sau đó, 10 μL dung dịch kháng thể chứa ADP, hoặc dung dịch kháng thể chứa ATP, hoặc dung dịch kháng thể không chứa ATP hoặc ADP, được bổ sung vào mỗi giếng. 10 μL dòng tế bào GloResponseTM NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chỉnh tới nồng độ $2 \times 10^6/\text{mL}$ bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) sau đó được thêm vào mỗi giếng. Nồng độ cuối cùng của ADP là 10 μM và nồng độ cuối cùng của ATP là 10 μM . Sau khi để yên đĩa trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂, đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và bổ sung 30 μL thuốc thử Bio-Glo vào mỗi giếng. Đối với thuốc thử Bio-Glo, hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (hệ đệm và chất nền) được sử dụng. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị

đọc đĩa. Hoạt tính chủ vận CD137 có thể được đánh giá bằng đơn vị sáng tương đối (còn được gọi là số lần phát quang hoặc số lần thay đổi) của độ phát quang của các giếng được bổ sung mỗi kháng thể kháng lại độ phát quang của các giếng không được bổ sung kháng thể bất kỳ.

Theo một phương án, khi hoạt tính chủ vận đối với CD137 được đo bằng thử nghiệm gen chỉ thị, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với CD137 có mặt hợp chất phân tử nhỏ nếu (i) hoạt tính chủ vận đối với CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ cao hơn 1,1 lần trở lên, 1,2 lần trở lên, 1,3 lần trở lên, 1,5 lần trở lên, 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với (ii) hoạt tính chủ vận CD137 (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ. Theo một phương án, nồng độ cuối cùng của kháng thể ở (i) và (ii) nêu trên là 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, hoặc 10 μ g/mL, và theo phương án được ưu tiên, là 0,1 μ g/mL hoặc 1 μ g/mL.

Theo phương án khác, khi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được bổ sung ở nồng độ cụ thể (ví dụ, ở nồng độ cuối cùng là 0,001, 0,01, 0,1, 1, hoặc 10 μ g/mL, hoặc 0,1 μ g/mL hoặc 1 μ g/mL theo phương án được ưu tiên), kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh giá là về căn bản không bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 khi không có hợp chất phân tử nhỏ nếu số lần cảm ứng (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ là 10 hoặc thấp hơn, 9 hoặc thấp hơn, 8 hoặc thấp hơn, hoặc 5 hoặc thấp hơn theo phương án được ưu tiên, và về căn bản là 1 theo phương án được ưu tiên hơn. Theo một phương án, “số lần cảm ứng (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ về căn bản là 1” nghĩa là các trường hợp khi số lần cảm ứng (đơn vị sáng tương đối) khi không có hợp chất phân tử nhỏ nhỏ hơn 2 lần, nhỏ hơn 1,9 lần, nhỏ hơn 1,8 lần, nhỏ hơn 1,7 lần, nhỏ hơn 1,6 lần, nhỏ hơn 1,5 lần, nhỏ hơn 1,4 lần, nhỏ hơn 1,3 lần, nhỏ hơn 1,2 lần, hoặc nhỏ hơn 1,1 lần.

c) Nồng độ huyết tương

Theo một phương án, các chỉ số động học trong máu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế được đo và/hoặc so sánh bằng cách sử dụng chuột knock-in CD137 của người. Chuột knock-in CD137 của

người được chuẩn bị, ví dụ, bằng cách thay thế gen CD137 của chuột bằng gen CD137 của người bằng cách đưa vector thay thế gen CD137 của người vào tế bào gốc phôi của chuột (các tế bào ES). Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên CD137 theo sáng chế được sử dụng thông qua một lần sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch duy nhất cho chuột knock-in CD137 của người, và máu được thu nhiều lần theo thời gian từ thời điểm ngay lập tức sau khi sử dụng đến khoảng 5 ngày, 10 ngày, 15 ngày, 20 ngày, 25 ngày, hoặc 30 ngày sau khi sử dụng. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên CD137 theo sáng chế được sử dụng thông qua một lần sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch duy nhất cho chuột knock-in CD137 của người, và máu được thu nhiều lần theo thời gian từ 5 phút đến 28 ngày sau khi sử dụng. Huyết tương nhanh chóng được tách ra từ máu thu được, và nồng độ kháng thể trong huyết tương được đo bằng điện hóa phát quang (ECL). Theo một phương án, nồng độ kháng thể trong huyết tương có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 6-3-2.

Trong phép đo thời gian bán thải trong huyết tương sử dụng chuột knock-in CD137 của người, nếu kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 biến mất khỏi huyết tương chậm hơn phân tử tham chiếu, thì kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh giá là có các chỉ số động học máu cải thiện hơn so với phân tử tham chiếu. Ngoài ra, nếu kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ (phân tử chuyển hoặc kháng thể chuyển) biến mất khỏi huyết tương chậm hơn kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ (phân tử không chuyển hoặc kháng thể không chuyển), nó có thể được đánh giá là phân tử chuyển (hoặc kháng thể chuyển) không liên kết với CD137 được biểu hiện trong mô không phải khối u so với phân tử không chuyển (kháng thể không chuyển).

d) Hoạt tính kháng u

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 của nó được thử nghiệm đối với khả năng ức chế sự tăng sinh hoặc sinh trưởng tế bào *in vivo*. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 của nó được thử nghiệm đối với khả năng ức chế sự phát triển khối u *in vivo*. Hệ thống mô hình *in vivo*, chẳng hạn như các mô hình ghép cùng loại hoặc khác loại, có thể được sử dụng đối với thử nghiệm này. Trong

hệ thống ghép khác loại làm ví dụ, các tế bào khối u của người được đưa vào động vật không phải người bị suy giảm miễn dịch một cách thích hợp, ví dụ, chuột trụi lông. Kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho động vật. Khả năng của kháng thể để ức chế hoặc làm giảm sự sinh trưởng của khối u được đo. Theo các phương án nhất định về hệ thống ghép khác loại nêu trên, các tế bào khối u của người là các tế bào khối u từ người bệnh. Các mô hình ghép khác loại này có sẵn trên thị trường từ Oncotest GmbH (Friedberg, Đức). Theo các phương án nhất định, các tế bào khối u của người được đưa vào động vật không phải người bị suy giảm miễn dịch một cách thích hợp bằng cách tiêm dưới da hoặc bằng cách cấy ghép vào vị trí thích hợp, chẳng hạn như đệm mỡ ở tuyến vú.

Theo một phương án, hoạt tính kháng u của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có thể được đo và/hoặc so sánh bằng cách sử dụng mô hình ghép tế bào khối u đồng loại dựa trên chuột knock-in CD137 của người được mô tả ở trên. Dòng tế bào ung thư để sử dụng trong thử nghiệm có thể được lựa chọn một cách thích hợp, nhưng tốt hơn là dòng tế bào ung thư ruột kết ở chuột dòng tế bào MC38. Theo một phương án, dòng tế bào MC38 được cấy dưới da ở vùng bụng của chuột, và mô hình được coi là được thiết lập khi thể tích khối u đạt khoảng 50-300 mm³. Sau khi thiết lập mô hình, chuột được cấy tế bào MC38 được nhóm lại và sau đó tiếp nhận sử dụng mỗi kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137. Theo một phương án, phép đo thể tích khối u được thực hiện với tần suất một đến hai lần một tuần, để đánh giá hoạt tính kháng u. Thể tích khối u được tính toán bằng cách sử dụng phép tính sau: thể tích khối u = (trục lớn x trục nhỏ x trục nhỏ)/2. Theo một phương án, hoạt tính kháng u của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được thử nghiệm và đánh giá theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 6-4.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được nhận định là bộc lộ hoạt tính kháng u khi thể tích khối u trong nhóm được sử dụng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 nhỏ hơn so với trong nhóm tá dược lỏng, hoặc sự tăng thể tích khối u trong nhóm được sử dụng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 nhỏ hơn so với trong nhóm tá dược lỏng.

e) Phản ứng toàn thân

Theo một phương án, phản ứng toàn thân của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế được đo và/hoặc so sánh bằng cách sử dụng mô hình ghép tế bào khối u đồng loại dựa trên chuột knock-in CD137 của người được mô tả ở trên. Các cơ quan được đo phản ứng toàn thân có thể được lựa chọn một cách thích hợp, nhưng tốt hơn là gan, lá lách, và/hoặc hạch bạch huyết. Theo một phương án, phản ứng toàn thân được đánh giá bằng cách cắt bỏ gan, lá lách, và/hoặc hạch bạch huyết từ chuột knock-in CD137 của người tại thời điểm thích hợp sau khi sử dụng các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137. Khi cơ quan cắt bỏ là lá lách và/hoặc hạch bạch huyết, cơ quan này được cân và/hoặc các tế bào trong phần lympho bào được đếm. Trong quá trình đếm, tốt hơn là, phần lympho bào sau khi tan máu được sử dụng cho lá lách và phần lympho bào thu được bằng cách đồng nhất được sử dụng cho hạch bạch huyết. Khi cơ quan cắt bỏ là gan, các tế bào trong phần lympho bào thu được bằng bộ kit phân ly gan, chuột (Milteny Biotec) được đếm. Ngoài ra, phép phân tích tế bào T bằng cách sử dụng phép đo tế bào theo dòng (FCM) có thể được thực hiện trên phần lympho bào từ mỗi cơ quan (gan, lá lách, và/hoặc hạch bạch huyết). Trong phép phân tích FCM, sự biểu hiện Gzayme B hoặc sự biểu hiện PD-1 hoặc sự biểu hiện ICOS trong các tế bào T dương tính với CD8-alpha hoặc tỷ lệ giữa các tế bào T dương tính với CD8-alpha với các tế bào dương tính với CD45 được sử dụng, ví dụ. Theo một phương án, phản ứng toàn thân và các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có thể được thử nghiệm và đánh giá theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 6-4.

Theo một phương án, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được nhận định là gây ức chế phản ứng toàn thân và/hoặc ức chế sự hoạt hóa của các tế bào miễn dịch trong mô không phải khối u (ví dụ, gan, lá lách, và/hoặc hạch bạch huyết) so với phân tử tham chiếu, khi nhóm được sử dụng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 thể hiện giá trị thấp hơn trong phép đánh giá các chỉ số khác nhau được mô tả ở trên so với giá trị của nhóm tiếp nhận sử dụng cùng một lượng phân tử tham chiếu. Ngoài ra, khi nhóm tiếp nhận sử dụng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 có hoạt tính liên kết phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ (phân tử chuyển hoặc kháng thể chuyển) thể hiện giá trị thấp hơn trong phép đánh giá các chỉ số khác nhau được mô tả ở trên so với giá trị của nhóm tiếp nhận sử dụng cùng một lượng kháng thể hoặc phân tử

liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ (phân tử không chuyển hoặc kháng thể không chuyển), phân tử chuyển (hoặc kháng thể chuyển) được nhận định là gây ức chế phản ứng toàn thân và/hoặc ức chế sự hoạt hóa của các tế bào miễn dịch ở mô không phải khối u (ví dụ, gan, lá lách, và/hoặc hạch bạch huyết) so với phân tử không chuyển (hoặc kháng thể không chuyển).

Sẽ được đánh giá rằng phương pháp đo bất kỳ được mô tả ở trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc ngoài các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

D. Thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 ở đây tiếp hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, chẳng hạn như các chất trị liệu hóa học hoặc dược chất, các chất ức chế phát triển, các độc tố (ví dụ, độc tố protein, các độc tố hoạt hóa enzym của vi khuẩn, nấm, có nguồn gốc động vật hoặc thực vật, hoặc các đoạn của nó), hoặc các chất đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) mà trong đó kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều dược chất, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, maytansinoid (xem Patent Mỹ các số 5,208,020, 5,416,064 và patent châu Âu EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc dược chất monomethylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem Patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298); dolastatin; calicheamicin hoặc dẫn xuất của nó (xem Patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman et al. 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); anthracycline như daunomycin hoặc doxorubicin (xem Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); và patent Mỹ số 6,630,579); metotrexat; vindesine; taxane như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothecene; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả ở đây tiếp hợp với độc tố hoạt hóa enzym hoặc đoạn của nó, bao gồm nhưng không giới hạn ở chuỗi A bạch hầu, đoạn hoạt hóa không liên kết của độc tố bạch hầu, chuỗi A ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A rixin, chuỗi A abrin, chuỗi A modeccin, alpha-sarcin, protein *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crocin, chất ức chế *saponaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và tricothecene.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả ở đây được tiếp hợp với nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo ra thể gắn kết phóng xạ. Nhiều loại đồng vị phóng xạ khác nhau là sẵn có để sản xuất các thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb và các chất đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử phóng xạ cho các nghiên cứu xạ hình, ví dụ, Tc-99m hoặc ^{123}I , hoặc chất đánh dấu quay dừng cho phương pháp chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là chụp cộng hưởng từ, MRI), như iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nito-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các thể tiếp hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều chất tạo cặp với protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt động (như disuxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo hoạt động (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch ricin có thể được điều chế như đã mô tả trong Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat làm ví dụ để tiếp hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026. Liên kết này có thể là “liên kết có thể phân cắt được” tạo thuận lợi cho việc giải phóng được chất gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, liên kết không bền với axit, liên kết nhạy với peptitaza, liên kết không bền với ánh sáng, liên kết

dimethyl hoặc liên kết chứa disulfua (ví dụ, xem Chari et al. *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patent Mỹ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Các thể tiếp hợp miễn dịch hoặc các ADC ở đây rõ ràng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các thể tiếp hợp được điều chế bằng các chất phản ứng liên kết chéo bao gồm, nhưng không giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) mà có sẵn trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Phương pháp và chế phẩm để chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bất kỳ được đề xuất ở đây là hữu ích để phát hiện sự có mặt của phân tử liên kết kháng nguyên CD137 hoặc trong mẫu sinh học. Thuật ngữ “phát hiện” như được sử dụng ở đây bao gồm sự phát hiện định lượng hoặc định tính. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện được đề xuất. Theo một khía cạnh khác nữa, phương pháp phát hiện sự có mặt của CD137 trong mẫu sinh học được đề xuất. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 như được mô tả ở đây trong các điều kiện cho phép để liên kết kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 với CD137, và phát hiện xem phức hợp có được tạo ra giữa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 và CD137 hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được sử dụng để chọn đối tượng thích hợp cho liệu pháp bằng kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137, ví dụ, trong đó CD137 là chất đánh dấu sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Các rối loạn làm ví dụ mà có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được đánh dấu. Các chất đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đánh dấu hoặc các gốc mà được phát hiện trực tiếp (như các chất đánh dấu huỳnh quang, chất mang màu, chất đánh dấu mật độ điện tử, chất phát quang hóa học, và chất phóng xạ), cũng như các gốc, như các enzym hoặc các phối tử, mà được phát hiện gián tiếp, ví dụ, qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , và ^{131}I , các nhóm huỳnh quang như các chelat đất hiếm hoặc florescein và các dẫn xuất của nó, rodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbeliferone, các luxiferaza, ví dụ, luxiferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn (Patent Mỹ số 4,737,456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xantin oxidaza, được ghép cặp với enzym sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, các chất đánh dấu spin, các chất đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

F. Dược phẩm

Dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 như được mô tả ở đây được điều chế bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng chế phẩm được đông khô hoặc dung dịch nước. Các chất mang dược dụng thường là không độc với người nhận ở các liều và nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; rượu phenol, butyl hoặc benzyl; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit có phân tử nhỏ (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit,

disacarit, và cacbonhydrat khác bao gồm cả glucoza, manosa, hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehalosa hoặc sorbitol; ion đôi tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, các phức Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang được dùng làm ví dụ ở đây còn bao gồm các chất phân tán được chất giữa các kẽ như glycoprotein hyaluronidaza hoạt động-trung tính hòa tan (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein hyaluronidaza PH-20 hòa tan của người, như rHuPH20 (HYLENEX, (nhãn hiệu đã được đăng ký), Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP làm ví dụ và các phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong Công bố đơn patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các dạng bào chế kháng thể đông khô làm ví dụ được mô tả trong Patent Mỹ số 6,267,958. Các bào chế kháng thể nước bao gồm các bào chế được mô tả trong Patent Mỹ số 6,171,586 và WO2006/044908, các bào chế sau bao gồm dung dịch đậm histidin-axetat.

Các thành phần hoạt tính có thể được giữ trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng phương pháp polyme hóa bề mặt phân cách, ví dụ, đối với các vi nang hydroxymethylxenluloza hoặc gelatin và các vi nang poly-(methylmethacrylat), lần lượt trong các hệ phân phối được chất dạng keo (ví dụ, các hạt liposom, các vi cầu albumin, vi nhũ tương, các hạt nano và các nang nano) hoặc trong nhũ tương thô. Các kỹ thuật này được mô tả trong *Remington's Pharmaceutical Sciences* xuất bản lần thứ 16, Osol, A. Ed. (1980)).

Các chế phẩm giải phóng duy trì có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm cơ chất bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, mà cơ chất này là ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc vi nang.

Nhìn chung, các dạng bào chế được sử dụng cho cách dùng *in vivo* thường là vô trùng. Việc vô trùng có thể được thực hiện dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng.

G. Phương pháp điều trị và chế phẩm điều trị

Các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bất kỳ được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu.

Theo một khía cạnh, trong sáng chế này, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng làm thuốc được đề xuất. Theo sáng chế, các ví dụ về thuốc cụ thể bao gồm các thuốc để gây ra tác động kháng u, ví dụ, ức chế quá trình tân tạo mạch ở khối u, ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u, làm suy kiệt tế bào B phát triển khối u, v.v., thông qua sự hoạt hóa của các tế bào là kết quả của sự liên kết của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 với CD137 được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch chẳng hạn như các tế bào T. Theo khía cạnh khác, trong sáng chế, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng trong điều trị khối u được đề xuất. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng trong phương pháp điều trị được đề xuất. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể có khối u bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 cho cá thể. Theo các phương án khác, trong sáng chế, các ví dụ về khối u bao gồm khối u rắn mà trong đó các tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, các tế bào T dương tính với CD8, và/hoặc các tế bào T điều hòa (các tế bào Treg) đã xâm nhập vào đó.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng trong phương pháp hoạt hóa các tế bào miễn dịch ở cá thể, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 cho cá thể để hoạt hóa các tế bào miễn dịch chẳng hạn như tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, và/hoặc các tế bào T dương tính với CD8 (cụ thể hơn, các tế bào miễn dịch này đã xâm nhập vào mô khối u).

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 để sử dụng trong phương pháp phá hủy tế bào (ví dụ, các tế bào khối u) ở cá thể, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 cho cá thể. Theo các phương án nhất định, các ví dụ về khối u bao gồm khối u rắn mà trong đó tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, các tế bào T dương tính

với CD8, và/hoặc các tế bào T điều hòa (các tế bào Treg) đã xâm nhập vào đó. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong các phương án nêu trên tốt hơn là người.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 trong việc sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này dùng để điều trị khối u (tùy thuộc vào mục đích, có thể được gọi thích hợp hơn là “ung thư” (như được áp dụng dưới đây)). Theo các phương án khác, thuốc này để sử dụng trong phương pháp điều trị khối u (hoặc ung thư tùy thuộc vào mục đích), phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu thuốc này cho cá thể có khối u (hoặc ung thư tùy thuộc vào mục đích). Theo các phương án khác, thuốc này để gây ra tác động kháng u, ví dụ, ức chế quá trình tân tạo mạch ở khối u, ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u, làm suy kiệt tế bào B phát triển khối u, v.v., thông qua sự hoạt hóa của các tế bào do sự liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 với CD137 được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch chẳng hạn như các tế bào T. Theo các phương án khác, thuốc này để sử dụng trong phương pháp, ví dụ, ức chế quá trình tân tạo mạch ở khối u, ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u, làm suy kiệt tế bào B phát triển khối u, v.v., thông qua sự hoạt hóa của các tế bào do sự liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 với CD137 được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch chẳng hạn như các tế bào T ở cá thể, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của thuốc này cho cá thể. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị khối u. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 cho cá thể có khối u. Theo các phương án khác, trong sáng chế, các ví dụ về khối u bao gồm khối u rắn mà trong đó các tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, các tế bào T dương tính với CD8, và/hoặc các tế bào T điều hòa (các tế bào Treg) đã xâm nhập vào đó.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp hoạt hóa tế bào miễn dịch ở cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 cho cá thể. Theo các phương án khác, trong sáng chế, tế bào miễn dịch này bao gồm các tế bào miễn dịch chẳng hạn như tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên,

đại thực bào, và/hoặc các tế bào T dương tính với CD8 (cụ thể hơn, các tế bào miễn dịch này đã xâm nhập vào mô khối u).

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm tổn thương tế bào (cụ thể là, các tế bào khối u) ở cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các phương pháp này bao gồm sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 cho cá thể. Theo các phương án nhất định, các ví dụ về khối u bao gồm khối u rắn mà trong đó tế bào B, tế bào tua, tế bào tiêu diệt tự nhiên, đại thực bào, các tế bào T dương tính với CD8, và/hoặc các tế bào T điều hòa (các tế bào Treg) đã xâm nhập vào đó. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo các khía cạnh khác, trong sáng chế, dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được sử dụng cho các phương pháp điều trị được mô tả ở trên, sử dụng trong điều trị, và thuốc này có thể bao gồm lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 mà có mức độ hoạt hóa miễn dịch trong mô không phải khối u thấp hơn, so với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, mô không phải khối u bao gồm hạch bạch huyết, lá lách, và/hoặc gan.

Theo các phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được sử dụng cho các phương pháp điều trị được mô tả ở trên, sử dụng trong điều trị, và thuốc này có thể chứa lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 mà về căn bản không liên kết với CD137 được biểu hiện trong mô không phải khối u.

Theo các khía cạnh khác, dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được sử dụng cho các phương pháp điều trị được mô tả ở trên, sử dụng trong điều trị, và thuốc này có thể bao gồm lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 mà có thời gian bán thải trong máu kéo dài so với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

Theo các phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 được sử dụng cho các phương pháp điều trị được mô

tả ở trên, sử dụng trong điều trị, và thuốc này có thể bao gồm lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 mà có mức độ tác dụng phụ thấp so với phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 không có hoạt tính liên kết CD137 phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ.

Theo các phương án khác, các tác dụng phụ này bao gồm AST tăng, ALT tăng, sốt, buồn nôn, viêm gan cấp tính, tổn thương gan, phì đại lách, viêm ruột non, viêm mủ da, giảm bạch cầu trung tính, giảm lympho bào, giảm tiểu cầu, biểu hiện của transaminaza, và/hoặc tăng bilirubin huyết.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 theo sáng chế có tác dụng phụ thấp, và do đó liều có thể được tăng lên mà không lo ngại về tác dụng phụ, và kết quả là, chúng có thể biểu hiện hiệu quả của thuốc mạnh hơn (hoạt tính gây độc tế bào hoặc hoạt tính kháng u).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dạng bào chế được chứa kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bất kỳ được đề xuất ở đây, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp trị liệu bất kỳ nêu trên. Theo một phương án, dạng bào chế được bao gồm kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang được dụng.

Kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng theo đường dùng thích hợp bất kỳ, bao gồm ngoài đường tiêu hóa, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để điều trị khu trú, sử dụng trong thương tổn. Phương pháp truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm phương thức dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Việc định liều có thể theo đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như trong tiêm tĩnh mạch hoặc dưới da, tùy thuộc một phần vào việc sử dụng này là trong thời gian ngắn hay lâu dài. Các phác đồ liệu điều trị khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều lần sử dụng ở nhiều thời điểm khác nhau, sử dụng liều lượng lớn, và truyền theo xung được đề xuất ở đây.

Kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế, định liều, và được sử dụng theo cách phù hợp với thực hành điều trị tốt. Các yếu tố để cân nhắc trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, động vật có vú cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối của chất, phương pháp sử dụng, phác đồ sử dụng thuốc, và các yếu tố khác mà

những người thực hành y khoa đã biết. Kháng thể này không cần phải, nhưng tùy ý được bào chế với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn đang được quan tâm. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong dạng bào chế, loại rối loạn hoặc phương pháp điều trị, và các yếu tố khác được bàn luận trên đây. Các dạng này thường được sử dụng ở các liều giống nhau và bằng các đường dùng như được mô tả ở đây, hoặc từ khoảng 1 đến 99% các liều được mô tả ở đây, hoặc ở liều bất kỳ và bằng đường dùng bất kỳ đã được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp.

Để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, liều thích hợp của kháng thể theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần được điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và diễn biến của bệnh, dù kháng thể được sử dụng với mục đích phòng ngừa hay điều trị, liệu pháp trước đó, tiền sử lâm sàng và đáp ứng của bệnh nhân với kháng thể và cân nhắc của bác sĩ điều trị. Kháng thể này được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân trong một lần hoặc qua nhiều lần điều trị liên tục. Tùy theo loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 microgam/kg đến 15 mg/kg (ví dụ, 0,1mg/kg - 10 mg/kg) kháng thể có thể là liều thử ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, dù, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần sử dụng riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều hàng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1 microgam/kg đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được đề cập trên đây. Để sử dụng lặp lại trong nhiều ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường được duy trì đến khi xuất hiện tác dụng mong muốn để ngăn chặn các triệu chứng bệnh. Một liều điển hình của kháng thể sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05mg/kg đến 10mg/kg. Vì vậy, có thể sử dụng cho bệnh nhân một hoặc nhiều liều trong số khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng). Có thể sử dụng các liều này một cách ngắt quãng, ví dụ, hằng tuần hoặc ba tuần một lần, (ví dụ, sao cho bệnh nhân tiếp nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc, ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều tấn công khởi đầu cao hơn, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tiến trình của liệu pháp này được theo dõi dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Được hiểu là bất kỳ trong số các dạng bào chế hoặc phương pháp điều trị trên đây có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc cộng thêm vào kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

H. Vật phẩm của quy trình sản xuất

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật phẩm của quy trình sản xuất chứa các nguyên liệu hữu ích cho việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả trên đây. Vật phẩm của quy trình sản xuất bao gồm đồ chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng nằm trên hoặc đi kèm theo đồ chứa. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi dung dịch IV v.v.... Các đồ chứa này có thể được làm từ nhiều loại vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Đồ chứa đựng chế phẩm là bản thân nó và có thể có cổng tiếp cận vô trùng (ví dụ, đồ chứa có thể là túi chứa dung dịch tiêm trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút chặn có thể đâm xuyên được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một thành phần hoạt tính trong chế phẩm này là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng được chọn. Vật phẩm của quy trình sản xuất theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng các chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị một tình trạng cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm của quy trình sản xuất có thể còn bao gồm đồ chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa dung dịch đệm được dụng, như nước kim hãm vi khuẩn dùng để tiêm (bacteriostatic water for injection-BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác thích hợp theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim, và bơm tiêm khác.

Thuật ngữ “tờ hướng dẫn sử dụng” được sử dụng để chỉ các hướng dẫn thường nằm trong các gói sản phẩm trị liệu thương mại, mà chứa thông tin về các chỉ định, công dụng, liều lượng, cách sử dụng, liệu pháp kết hợp, các chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

Cần phải hiểu rằng vật phẩm của quy trình sản xuất bất kỳ nêu trên có thể bao gồm thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc bổ sung cho kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137.

III Các chế phẩm và phương pháp (phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận và phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào chứa vùng Fc biến đổi với điểm đẳng điện (pI) tăng)

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận chứa vùng Fc biến đổi với điểm đẳng điện (pI) tăng và phương pháp sử dụng chúng. Theo một số phương án, polypeptit chứa vùng Fc biến đổi làm tăng pI bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin với vùng Fc gốc. Theo các phương án khác, mỗi biến đổi axit amin này làm cho điểm đẳng điện (pI) của vùng Fc biến đổi tăng so với vùng Fc gốc. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, được tin rằng pH của các dịch sinh học (ví dụ, huyết tương) nằm trong khoảng pH trung tính. Trong các dịch sinh học, điện tích dương thực của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên làm tăng pI tăng lên do pI tăng, và kết quả là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này bị hút mạnh hơn bởi tương tác Coulomb hóa lý với bề mặt tế bào màng trong mà có điện tích âm thực so với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên không có pI tăng. Bằng cách này, phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận (hoặc kháng thể), hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận được liên kết kháng nguyên (hoặc kháng thể) có thể đến gần hơn tới bề mặt các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc, dẫn đến khả năng liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên với các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc tăng. Đối với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận thể hiện hoạt tính chủ vận dựa trên sự đóng góp bởi hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận có khả năng liên kết tăng đối với các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc do các biến đổi axit amin làm tăng pI có thể bộc lộ hoạt tính chủ vận mạnh hơn so với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận không có các biến đổi axit amin làm tăng pI. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận này là phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD3. Theo phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận này là các kháng thể kháng CD137 hoặc các kháng thể kháng CD3.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào chứa vùng Fc biến đổi với điểm đẳng điện (pI) tăng và phương pháp sử dụng chúng. Trong các dịch sinh học, điện tích dương thực của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên làm tăng pI tăng lên do pI tăng, và kết quả là kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên này bị hút mạnh hơn bởi tương tác Coulomb hóa lý với bề mặt tế bào màng trong mà có điện tích âm thực so với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên không có pI tăng. Bằng cách này,

phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào (hoặc kháng thể), hoặc phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào được liên kết kháng nguyên (hoặc kháng thể) có thể đến gần hơn tới bề mặt các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc, dẫn đến khả năng liên kết của kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên với các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc tăng. Đối với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào thể hiện hoạt tính gây độc tế bào dựa trên sự đóng góp bởi hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc, các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào có khả năng liên kết tăng đối với các tế bào biểu hiện thụ thể gamma Fc do các biến đổi axit amin làm tăng pI có thể bộc lộ hoạt tính chủ vận mạnh hơn so với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào không có các biến đổi axit amin làm tăng pI.

Theo một phương án, tác dụng gây độc tế bào có ở phân tử liên kết kháng nguyên gây độc tế bào bao gồm, ví dụ, tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và tác dụng thực bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) được gây ra bởi các tế bào hiệu ứng.

Theo sáng chế, pI có thể là pI được xác định dựa trên thực nghiệm hoặc lý thuyết. Giá trị pI có thể được xác định, ví dụ, bằng cách tập trung điểm đẳng điện đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Giá trị pI trên lý thuyết có thể được tính toán, ví dụ, sử dụng phần mềm phân tích gen và trình tự axit amin (Genetyx, v.v.). Trong quá trình tính toán, các đặc tính của kháng thể có thể được phản ánh trong công thức tính. Ví dụ, (i) thông thường, Cys được bảo toàn trong kháng thể tạo thành liên kết disulfua và không tích điện của chuỗi bên; do đó, Cys này có thể được loại khỏi tính toán và chỉ Cys dạng tự do không tạo liên kết disulfua có thể được đưa vào phép tính. Theo cách khác, (ii) trạng thái điện tích hoặc điểm đẳng điện của các kháng thể có thể được thay đổi do các cải biến sau dịch mã; do đó, công thức tính có thể được thay đổi như sau, xét đến các cải biến sau dịch mã này: (a) khi tận cùng N của chuỗi nặng là Q (glutamin), nhóm amino tận cùng N được loại khỏi phép tính, giả sử quá trình pyroglutamyl hóa xảy ra, (b) khi tận cùng C của chuỗi nặng là K (lysin), K (chỉ một gốc) được loại khỏi phép tính, giả sử sự cắt bỏ xảy ra; và (c) các chuỗi bên của toàn bộ C (xystein) có ở các vị trí thường được bảo toàn được loại khỏi phép tính, giả sử tất cả các C này tạo thành liên kết disulfua trong phân tử. Theo một phương án được ưu tiên, cả (i) và (ii) được mô tả ở trên có thể được phản ánh trong công thức tính.

Theo một phương án, giá trị pI có thể được tăng, ví dụ, ít nhất bằng 0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, hoặc cao hơn, ít nhất bằng 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, hoặc cao hơn, ít nhất bằng 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, hoặc cao hơn, hoặc ít nhất bằng 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0 hoặc cao hơn, so với cải biến trước đó.

Theo các phương án nhất định, axit amin để pI tăng có thể được bọc lộ trên bề mặt của vùng Fc biến đổi. Theo sáng chế, axit amin mà có thể được bọc lộ trên bề mặt thường dùng để chỉ gốc axit amin nằm trên bề mặt của polypeptit hình thành vùng Fc biến đổi. Gốc axit amin nằm trên bề mặt của polypeptit dùng để chỉ gốc axit amin có chuỗi bên có thể được tiếp xúc với các phân tử hòa tan (mà nhìn chung chủ yếu là các phân tử nước). Tuy nhiên, chuỗi bên không nhất thiết phải tiếp xúc hoàn toàn với các phân tử hòa tan, và thậm chí khi một phần chuỗi bên tiếp xúc với các phân tử hòa tan, axit amin này được xác định là "gốc axit amin nằm trên bề mặt". Các gốc axit amin nằm trên bề mặt của polypeptit còn bao gồm gốc axit amin nằm gần với bề mặt và do đó có thể có ảnh hưởng điện tích từ một gốc axit amin khác có chuỗi bên, thậm chí là một phần, được tiếp xúc với các phân tử hòa tan. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể chuẩn bị mô hình tương đồng của polypeptit, ví dụ, sử dụng các phần mềm có sẵn trên thị trường. Theo cách khác, có thể sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, chẳng hạn như tinh thể học tia X. Các gốc axit amin mà có thể được bọc lộ trên bề mặt được xác định, ví dụ, sử dụng tọa độ từ mô hình ba chiều sử dụng chương trình máy tính chẳng hạn như chương trình InsightII (Accelrys). Các vị trí có thể tiếp xúc bề mặt có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Lee and Richards (J. Mol. Biol. 55:379-400 (1971)); Connolly (J. Appl. Cryst. 16:548-558 (1983))). Các vị trí có thể tiếp xúc bề mặt có thể được xác định bằng cách sử dụng phần mềm thích hợp đối với mô hình protein và thông tin cấu trúc ba chiều. Phần mềm sẵn có cho các mục đích này bao gồm, ví dụ, phần mềm mô đun polyme sinh học SYBYL (Tripos Associates). Khi thuật toán yêu cầu người dùng nhập thông số kích thước, "kích thước" của đầu dò được sử dụng trong phép tính có thể được cài đặt bán kính khoảng 1,4 Angstrom (Å) hoặc nhỏ hơn. Ngoài ra, phương pháp xác định các vùng có thể lộ ra trên bề mặt sử dụng phần mềm cho máy tính cá nhân đã được mô tả bởi Pacios (Comput. Chem. 18(4):377-386 (1994); J. Mol. Model. 1:46-53 (1995)). Dựa trên các thông tin như

được mô tả ở trên, các gốc axit amin thích hợp nằm trên bề mặt của polypeptit hình thành vùng Fc biến đổi có thể được lựa chọn.

Các phương pháp làm tăng pI bằng cách đưa đột biến thể axit amin đơn vào vùng hằng định kháng thể không bị giới hạn cụ thể và, ví dụ, có thể được thực hiện dựa trên phương pháp được mô tả trong WO 2014/145159. Đối với đột biến thể axit amin để đưa vào vùng hằng định, tốt hơn là đưa (các) đột biến thể axit amin để làm giảm số lượng axit amin có điện tích âm (ví dụ, axit aspartic hoặc axit glutamic) trong khi làm tăng các axit amin có điện tích dương (ví dụ, arginin hoặc lysin), như trong trường hợp vùng biến đổi.

Mặc dù không bị giới hạn cụ thể, đối với các vị trí để đưa đột biến thể axit amin vào trong vùng hằng định, các vị trí mà các chuỗi bên axit amin có thể lộ ra trên bề mặt phân tử kháng thể được ưu tiên. Các ví dụ được ưu tiên bao gồm phương pháp đưa nhiều đột biến thể axit amin kết hợp vào các vị trí này mà có thể lộ ra trên bề mặt phân tử kháng thể. Theo cách khác, ưu tiên là đa số các đột biến thể axit amin để đưa vào là ở các vị trí gần nhau trong cấu trúc ba chiều. Nhiều đột biến thể axit amin được đưa vào tốt hơn là đột biến thể với các axit amin tích điện dương mà trong một số trường hợp có thể dẫn đến trạng thái nhiều điện tích dương được mang ở các vị trí gần nhau trong cấu trúc ba chiều, mặc dù chúng không bị giới hạn cụ thể ở đó. Định nghĩa “các vị trí gần trong cấu trúc ba chiều” ở đây không bị giới hạn cụ thể, nhưng ví dụ, có thể có nghĩa là trạng thái đột biến thể axit amin đơn hoặc nhiều đột biến thể axit amin được đưa vào là cách nhau 45 Angstrom trở xuống, 40 Angstrom trở xuống, 30 Angstrom trở xuống, 20 Angstrom trở xuống, tốt hơn là 15 Angstrom trở xuống, hoặc tốt hơn nữa là 10 Angstrom trở xuống. Dù đột biến thể axit amin quan tâm có ở các vị trí lộ ra trên bề mặt phân tử kháng thể, hay nhiều vị trí đột biến thể axit amin được đặt gần nhau có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết chẳng hạn như tinh thể học tia X.

Theo một phương án, các vùng Fc biến đổi tăng pI bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422, và 431, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, các vùng Fc biến đổi tăng pI bao gồm Arg hoặc Lys tại mỗi vị trí được chọn.

Theo các phương án khác, các vùng Fc biến đổi tăng pI bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 311, 343, và 413, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, các vùng Fc biến đổi tăng pI bao gồm sự biến đổi axit amin tại các vị trí 311, 343, hoặc 413, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, các vùng Fc biến đổi tăng pI bao gồm Arg hoặc Lys tại mỗi vị trí được chọn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến đổi làm tăng pI, bao gồm các sự biến đổi axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (3) sau: (1) tại các vị trí 311 và 343; (2) tại các vị trí 311 và 413; và (3) tại các vị trí 343 và 413, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, các vùng Fc biến đổi tăng pI bao gồm Arg hoặc Lys tại mỗi vị trí được chọn.

Phương pháp làm tăng pI của protein là, ví dụ, để làm giảm số lượng các axit amin với chuỗi bên tích điện âm (ví dụ, axit aspartic và axit glutamic) và/hoặc để làm tăng số lượng các axit amin với chuỗi bên tích điện dương (ví dụ, arginin, lysin và histidin) ở điều kiện pH trung hòa. Các axit amin có chuỗi bên tích điện âm có điện tích âm được biểu thị là -1 ở điều kiện pH đủ cao hơn chuỗi bên pKa của nó, đây là lý thuyết đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, pKa lý thuyết đối với chuỗi bên của axit aspartic là 3,9, và chuỗi bên có điện tích âm được biểu diễn là -1 ở điều kiện pH trung tính (ví dụ, trong dung dịch có pH 7,0). Ngược lại, các axit amin có chuỗi bên tích điện dương có điện tích dương được biểu diễn là +1 ở điều kiện pH đủ thấp hơn so với chuỗi bên pKa của nó. Ví dụ, pKa lý thuyết đối với chuỗi bên của arginin là 12,5, và chuỗi bên có điện tích dương được biểu diễn là +1 ở điều kiện pH trung tính (ví dụ, trong dung dịch có pH 7,0). Trong khi đó, các axit amin có chuỗi bên không có điện tích ở điều kiện pH trung tính (ví dụ, trong dung dịch có pH 7,0) đã biết bao gồm 15 loại axit amin tự nhiên, tức là, alanin, xystein, phenylalanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, methionin, asparagin, prolin, glutamin, serin, threonin, valin, tryptophan, và tyrosin. Tất nhiên, được hiểu là các axit amin để làm tăng pI có thể là các axit amin không tự nhiên.

Từ những điều trên, phương pháp làm tăng pI của protein ở điều kiện pH trung tính (ví dụ, trong dung dịch có pH 7,0) có thể tạo ra sự thay đổi điện tích +1 với protein quan tâm, ví dụ, bằng cách thay thế các axit amin bằng các chuỗi bên không tích điện đối với axit aspartic hoặc axit glutamic (mà chuỗi bên có điện tích âm là -1) trong trình tự axit amin của protein. Ngoài ra, sự thay đổi điện tích +1 có

thể được tạo ra với protein, ví dụ, bằng cách thay thế arginin hoặc lysin (mà chuỗi bên của nó có điện tích dương là +1) đối với các axit amin mà chuỗi bên của nó không tích điện. Hơn nữa, sự thay đổi điện tích +2 có thể được tạo ra tại thời điểm với protein bằng cách thay thế arginin hoặc lysin (mà chuỗi bên của nó có điện tích dương là +1) đối với axit aspartic hoặc axit glutamic (mà chuỗi bên của nó có điện tích âm là -1). Theo cách khác, để làm tăng pI của protein, các axit amin với chuỗi bên không mang điện và/hoặc tốt hơn là các axit amin có chuỗi bên tích điện dương có thể được bổ sung hoặc cài xen vào trình tự axit amin của protein, hoặc các axit amin với chuỗi bên không mang điện và/hoặc tốt hơn là các axit amin với chuỗi bên tích điện âm có trong trình tự axit amin của protein có thể được xóa bỏ. Được hiểu rằng, ví dụ, các gốc axit amin tận cùng N và tận cùng C của protein có điện tích từ chuỗi chính (NH_3^+ của nhóm amin ở tận cùng N và COO^- của nhóm carbonyl ở tận cùng C) ngoài các điện tích từ chuỗi bên của chúng. Do đó, pI của protein cũng có thể được tăng bằng cách thực hiện cho các nhóm chức từ chuỗi chính một số bổ sung, mất đoạn, thay thế, hoặc cài xen.

Sự thay thế của axit amin để làm tăng pI bao gồm, ví dụ, sự thay thế axit amin có chuỗi bên không tích điện đối với axit amin có chuỗi bên tích điện âm, sự thay thế axit amin có chuỗi bên tích điện dương đối với axit amin có chuỗi bên không tích điện, và sự thay thế axit amin có chuỗi bên tích điện dương đối với axit amin có chuỗi bên tích điện âm trong trình tự axit amin của vùng Fc gốc, mà được thực hiện riêng hoặc kết hợp phù hợp.

Sự cài xen hoặc bổ sung axit amin để làm tăng pI bao gồm, ví dụ, sự cài xen hoặc bổ sung axit amin có chuỗi bên không tích điện, và/hoặc sự cài xen hoặc bổ sung axit amin có chuỗi bên tích điện dương trong trình tự axit amin của vùng Fc gốc, được thực hiện riêng hoặc kết hợp phù hợp.

Sự mất đoạn axit amin để làm tăng pI bao gồm, ví dụ, sự mất đoạn axit amin có chuỗi bên không tích điện, và/hoặc sự mất đoạn axit amin có chuỗi bên tích điện âm trong trình tự axit amin của vùng Fc gốc, được thực hiện riêng hoặc kết hợp phù hợp.

Theo một phương án, các axit amin tự nhiên được sử dụng để làm tăng pI có thể được phân loại như sau: (a) axit amin với chuỗi bên tích điện âm có thể là Glu (E) hoặc Asp (D); (b) axit amin có chuỗi bên không tích điện có thể là Ala (A), Asn

(N), Cys (C), Gln (Q), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y), hoặc Val (V); và (c) axit amin với chuỗi bên tích điện dương có thể là His (H), Lys (K), hoặc Arg (R). Theo một phương án, các đột biến thể hoặc cài xen axit amin sau cải biến là Lys (K) hoặc Arg (R).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận được phân lập chứa vùng Fc biến đổi với hoạt tính liên kết với thụ thể Fc-gamma tăng (tốt hơn là, hoạt tính liên kết của Fc gamma RIIb) và pI tăng. Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến đổi được mô tả ở đây bao gồm ít nhất hai sự biến đổi axit amin trong vùng Fc gốc. Như được mô tả ở trên, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có pI tăng bị hút mạnh hơn bởi tương tác Coulomb hóa lý với bề mặt tế bào màng trong mà có điện tích âm thực so với kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên không có pI tăng. Do đó, đối với các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận mà thể hiện hoạt tính chủ vận dựa trên sự đóng góp bởi hoạt tính liên kết đối với thụ thể gamma Fc (tốt hơn là Fc-gamma RIIb), có thể làm tăng hoạt tính chủ vận của các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách kết hợp (các) biến đổi axit amin để làm tăng thụ thể gamma Fc (tốt hơn là Fc-gamma RIIb) và (các) biến đổi axit amin để làm tăng pI. Đối với thuật ngữ “thụ thể gamma Fc”, phần giải thích được mô tả ở mục “II. Các chế phẩm và phương pháp (phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137)” được áp dụng tương tự.

Theo một phương án, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến đổi với hoạt tính liên kết FcγRIIb tăng và pI tăng chứa ít nhất ba sự biến đổi axit amin bao gồm: (a) ít nhất một biến đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm: 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 264, 266, 267, 268, 271, 295, 298, 325, 326, 327, 328, 330, 331, 332, 334, và 396, theo cách đánh số EU, và (b) ít nhất hai sự biến đổi axit amin của ít nhất hai vị trí được chọn từ nhóm bao gồm: 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422, và 431, theo cách đánh số EU.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến đổi dẫn đến hoạt tính liên kết FcγRIIb tăng và pI tăng, mà polypeptit bao gồm ít nhất 3 sự biến đổi axit amin chứa (a) ít nhất một biến đổi axit amin tại ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326, và 330 được trình bày bởi cách đánh số EU, và (b) ít nhất 2 đột biến axit amin tại ít

nhất 2 vị trí được chọn từ nhóm bao gồm các vị trí 311, 343, và 413 được trình bày bởi cách đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến đổi dẫn đến hoạt tính liên kết FcγRIIb tăng và pI tăng, chứa ít nhất một biến đổi axit amin từ điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (26) dưới đây (được trình bày bởi cách đánh số EU):

- (1) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343, và 413;
- (2) các vị trí 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343, và 413;
- (3) các vị trí 234, 238, 250, 264, 307, 330, 343, và 413;
- (4) các vị trí 234, 238, 264, 330, 343, và 413;
- (5) các vị trí 234, 237, 238, 250, 307, 330, 343, và 413;
- (6) các vị trí 234, 237, 238, 330, 343, và 413;
- (7) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, 311, và 343;
- (8) các vị trí 234, 238, 250, 264, 307, 330, 311, và 343;
- (9) các vị trí 234, 238, 264, 330, 311, và 343;
- (10) các vị trí 234, 237, 238, 250, 307, 330, 311, và 343;
- (11) các vị trí 234, 237, 238, 330, 311, và 343;
- (12) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 343;
- (13) các vị trí 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 343;
- (14) các vị trí 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 413;
- (15) các vị trí 214, 236, 268, 330, và 343;
- (16) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, và 343;
- (17) các vị trí 214, 236, 268, 330, và 413;
- (18) các vị trí 214, 236, 268, 330, 343, và 413;
- (19) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, 343 và 413;
- (20) các vị trí 214, 236, 268, 330, và 311;
- (21) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, và 311;

(22) các vị trí 214, 236, 268, 330, 311, và 343;

(23) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, 311, và 343;

(24) các vị trí 214, 236, 268, 330, 311, và 413;

(25) các vị trí 214, 235, 236, 268, 330, 311, và 413; và

(26) các vị trí 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, và 311.

Theo một phương án, vùng Fc biến đổi theo sáng chế bao gồm các biến đổi axit amin được nêu trong Bảng 6 dưới đây.

Các biến đổi axit amin làm tăng pI của vùng Fc

Bảng 6

Số	Đột biến thể axit amin (cách đánh số EU)
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

Theo một phương án, ngoài các biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 6 (sự biến đổi axit amin làm tăng pI của Fc), vùng Fc biến đổi của sáng chế bao gồm sự biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 7 dưới đây.

Các biến đổi axit amin làm tăng hoạt tính liên kết Fc γ RIIb của vùng Fc

Bảng 7

Số	Đột biến thể axit amin (cách đánh số EU)
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

Theo một phương án, vùng Fc biến đổi theo sáng chế bao gồm các biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 8 dưới đây. Theo phương án được ưu tiên, vùng Fc biến đổi theo sáng chế bao gồm đột biến mất đoạn axit amin tại vị trí 447 theo cách đánh số EU, ngoài các biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 8 dưới đây. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, vùng Fc biến đổi theo sáng chế bao gồm đột biến mất đoạn axit amin tại vị trí 446 và 447 theo cách đánh số EU, ngoài các biến đổi axit amin được mô tả trong Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

STT	Thay thế axit amin (cách đánh số EU)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R
16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

Bên cạnh những biến đổi được ví dụ ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng ít nhất một biến đổi axit amin mà làm tăng hoạt tính liên kết đối với FcγR bao gồm FcγRIIb so với vùng Fc gốc, ví dụ, như được mô tả hoặc gợi ý trong WO 2013/047752, WO 2013/125667, WO 2014/030728, WO

2014/163101, hoặc WO 2017/104783, và ít nhất một biến đổi axit amin làm tăng pI so với vùng Fc gốc, ví dụ, như được mô tả hoặc gợi ý trong WO 2017/104783 hoặc WO 2017/046994, và tổ hợp của các biến đổi axit amin này, có thể được sử dụng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận bao gồm cả vùng Fc biến đổi và miền liên kết kháng nguyên. Theo phương án khác, kháng nguyên này là kháng nguyên màng. Theo phương án khác, kháng nguyên này là thụ thể biểu hiện trên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, vùng Fc gốc có nguồn gốc từ IgG1 người. Theo phương án khác, polypeptit là kháng thể. Theo phương án khác, polypeptit là protein dung hợp Fc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận bao gồm vùng Fc biến đổi được nêu chi tiết ở trên (vùng Fc biến đổi với điểm đẳng điện (pI) tăng).

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có các đặc điểm bao gồm: đưa vào vùng Fc gốc ít nhất một biến đổi axit amin (như được mô tả ở trên) dẫn tới điểm đẳng điện (pI) tăng so với điểm đẳng điện của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc chứa vùng Fc gốc; và xác định và phân lập phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận trong đó hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận bao gồm vùng Fc biến đổi thu được là kết quả của việc đưa vào nêu trên được làm tăng so với hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận gốc.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có các đặc điểm là thu được vector biểu hiện chứa trình tự khởi đầu thích hợp có thể được liên kết với gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận nêu trên được xác định và phân lập như trên, đưa vector vào tế bào chủ, nuôi cấy tế bào chủ để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận, và phục hồi phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận nêu trên từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận có hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, hoặc 250 μ M hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, bằng phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận có hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 10 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận có hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 50 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận có hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi có mặt 250 μM trở lên hợp chất phân tử nhỏ là cao hơn 2 lần trở lên, 3 lần trở lên, 5 lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 60 lần trở lên, 70 lần trở lên, 80 lần trở lên, hoặc 90 lần trở lên, so với hoạt tính chủ vận đối với kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ.

Theo một phương án, trong phương pháp này, hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên có thể được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi các tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Theo một phương án, trong phương pháp này, hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên có thể được đánh giá bằng lượng IL-2 và/hoặc IFN- γ tạo ra bởi tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PMBC) ở người được phân lập hoặc các tế bào T có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) ở người.

Theo một phương án, trong phương pháp này, hoạt tính chủ vận của phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận đối với kháng nguyên có thể được đánh giá bằng thử nghiệm gen chỉ thị.

IV. Các phương pháp và chế phẩm (phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết với kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ)

A. Phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết với kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào nồng độ của hợp chất có khối lượng phân tử thấp

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ. Các phân tử này cũng có thể được đề cập đến là phân tử liên kết kháng nguyên phụ thuộc hợp chất phân tử nhỏ (có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ). Theo một số khía cạnh, phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng lên khi nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ trở nên cao hơn. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính liên kết kháng nguyên giảm xuống khi nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ trở nên cao hơn. Theo một phương án, khi hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ so với hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ, thì một giá trị cao hơn giá trị còn lại. Theo một phương án khác, khi hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt nồng độ cao hợp chất phân tử nhỏ so với hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt nồng độ thấp hợp chất phân tử nhỏ, thì một giá trị cao hơn giá trị còn lại. Theo các phương án nhất định, hợp chất phân tử nhỏ theo sáng chế là hợp chất đặc hiệu mô đích. Theo các phương án khác, hợp chất phân tử nhỏ theo sáng chế là hợp chất đặc hiệu mô khối u.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên có đặc tính duy trì cao trong huyết tương. Theo khía cạnh khác, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng lên khi nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ trở nên cao hơn. Theo các phương án nhất định, hợp chất phân tử nhỏ là hợp chất đặc hiệu mô đích. Theo các phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở mô đích cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở mô không phải mô đích. Theo một số khía cạnh, phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, sự thay đổi động lực học huyết tương được mô tả ở trên có thể được hiểu theo cách sau. Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên phụ thuộc nhiều vào nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô đích, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở các mô không phải mô đích sẽ thấp hơn. Kết quả là, sự thải trừ

phụ thuộc kháng nguyên (độ thanh thải) của phân tử liên kết kháng nguyên ở các mô không phải mô đích cũng sẽ trở nên thấp hơn. Sự thải trừ phụ thuộc kháng nguyên (độ thanh thải) thấp hơn ở hầu hết các mô trong cơ thể sống (tức là các mô không phải mô đích) dẫn tới về tổng thể là đặc tính duy trì cao hơn trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên. Có thể xác định xem phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có đặc tính duy trì cao trong huyết tương bằng cách so sánh với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô đích trở nên cao hơn sẽ có đặc tính duy trì cao hơn trong huyết tương so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên có sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ và khi không có hợp chất phân tử nhỏ là, ví dụ, 2 lần trở xuống, 1,8 lần trở xuống, 1,5 lần trở xuống, 1,3 lần trở xuống, 1,2 lần trở xuống, hoặc 1,1 lần trở xuống. Xét về việc thực hiện so sánh, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng khi có mặt lượng đủ hợp chất phân tử nhỏ về căn bản là giống nhau.

Ở đây, mức độ thải trừ phụ thuộc kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên được phát hiện *in vivo* được coi là làm thay đổi theo sự cân bằng số lượng kháng nguyên và phân tử liên kết kháng nguyên có trong huyết tương. Nói chung, được cho rằng càng có nhiều kháng nguyên/có ít phân tử liên kết kháng nguyên trong huyết tương, thì khả năng thải trừ phụ thuộc kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên càng trở nên dễ phát hiện. Nói chung, được cho rằng càng có ít kháng nguyên/có nhiều phân tử liên kết kháng nguyên trong huyết tương, thì khả năng thải trừ phụ thuộc kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên càng trở nên khó phát hiện. Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế không cần phải thể hiện đặc tính duy trì trong huyết tương cao trong mọi điều kiện, nhưng chỉ cần phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện đặc tính duy trì cao trong huyết tương trong điều kiện thích hợp tại đó sự thải trừ phụ thuộc kháng nguyên được phát hiện là đủ. Nếu lượng kháng nguyên trong huyết tương quá nhỏ, đặc tính duy trì trong huyết tương

có thể được đánh giá sau khi tăng lượng kháng nguyên bằng phương pháp nhân tạo bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp. Theo khía cạnh khác, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng lên khi nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ trở nên cao hơn. Theo các phương án nhất định, hợp chất phân tử nhỏ là hợp chất đặc hiệu mô đích. Theo các phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở mô đích cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở mô không phải mô đích. Theo một số khía cạnh, phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, sự thay đổi động lực học huyết tương được mô tả ở trên có thể được hiểu theo cách sau. Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên phụ thuộc nhiều vào nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô đích, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở các mô không phải mô đích sẽ thấp hơn. Kết quả là, phân tử liên kết kháng nguyên sẽ có khả năng hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể thấp hơn ở các mô không phải mô đích. Nói chung, được biết rằng khi kháng nguyên được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên chẳng hạn như kháng thể, độ thanh thải của kháng nguyên trở nên thấp hơn và nồng độ kháng nguyên trong huyết tương tăng (kháng nguyên tích tụ). Khả năng hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể thấp hơn ở hầu hết các mô trong cơ thể sống (tức là, các mô không phải mô đích) dẫn đến về tổng thể sự tích tụ kháng nguyên thấp hơn (nói cách khác, khả năng tích tụ kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên thấp hơn). Có thể xác định xem phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp bằng cách so sánh với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ của hợp chất đặc hiệu mô đích trở nên cao hơn sẽ có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên có sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ

và khi không có hợp chất phân tử nhỏ là, ví dụ, 2 lần trở xuống, 1,8 lần trở xuống, 1,5 lần trở xuống, 1,3 lần trở xuống, 1,2 lần trở xuống, hoặc 1,1 lần trở xuống. Xét về việc thực hiện so sánh, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng khi có mặt lượng đủ hợp chất về căn bản là giống nhau.

Ở đây, lượng phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành *in vivo* được coi là phụ thuộc vào lượng kháng nguyên và phân tử liên kết kháng nguyên có trong huyết tương. Nói chung, được coi là càng có nhiều kháng nguyên/ kháng thể trong huyết tương, càng nhiều phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành. Ngược lại, được coi là càng có ít kháng nguyên/ kháng thể trong huyết tương, càng ít phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành. Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế không cần phải thể hiện khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp trong mọi điều kiện, nhưng chỉ cần phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp trong điều kiện thích hợp tại đó lượng phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành là đủ. Nếu lượng kháng nguyên trong huyết tương quá nhỏ, khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương có thể được đánh giá sau khi tăng lượng kháng nguyên bằng biện pháp nhân tạo bất kỳ.

Theo một số phương án, sự khác biệt trong hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế là, ví dụ, hai lần trở lên, ba lần trở lên, năm lần trở lên, mười lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 200 lần trở lên, 300 lần trở lên, 500 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 2×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 5×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 2×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 5×10^4 lần trở lên, hoặc 1×10^5 lần trở lên.

Theo một số phương án, hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện bằng giá trị KD (hằng số phân ly). Theo các phương án khác, khi giá trị KD đối với phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ và giá trị KD của phân tử liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất phân tử nhỏ được so sánh, thì một giá trị nhỏ hơn giá trị còn lại. Theo cách khác, theo một phương án khác, khi giá trị KD của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt nồng độ hợp chất phân tử nhỏ so với giá trị KD của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt nồng độ thấp hợp chất phân tử nhỏ, thì một giá trị nhỏ hơn giá trị còn lại.

Theo các phương án khác, sự khác biệt về các giá trị KD của phân tử liên kết kháng nguyên là, ví dụ, hai lần trở lên, ba lần trở lên, năm lần trở lên, mười lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 200 lần trở lên, 300 lần trở lên, 500 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 2×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 5×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 2×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 5×10^4 lần trở lên, hoặc 1×10^5 lần trở lên. Giá trị KD của phân tử liên kết kháng nguyên nhỏ hơn có thể là, ví dụ, 9×10^{-7} M trở xuống, 8×10^{-7} M trở xuống, 7×10^{-7} M trở xuống, 6×10^{-7} M trở xuống, 5×10^{-7} M trở xuống, 4×10^{-7} M trở xuống, 3×10^{-7} M trở xuống, 2×10^{-7} M trở xuống, 1×10^{-7} M trở xuống, 9×10^{-8} M trở xuống, 8×10^{-8} M trở xuống, 7×10^{-8} M trở xuống, 6×10^{-8} M trở xuống, 5×10^{-8} M trở xuống, 4×10^{-8} M trở xuống, 3×10^{-8} M trở xuống, 2×10^{-8} M trở xuống, 1×10^{-8} M trở xuống, 9×10^{-9} M trở xuống, 8×10^{-9} M trở xuống, 7×10^{-9} M trở xuống, 6×10^{-9} M trở xuống, 5×10^{-9} M trở xuống, 4×10^{-9} M trở xuống, 3×10^{-9} M trở xuống, 2×10^{-9} M trở xuống, 1×10^{-9} M trở xuống, 9×10^{-10} M trở xuống, 8×10^{-10} M trở xuống, 7×10^{-10} M trở xuống, 6×10^{-10} M trở xuống, 5×10^{-10} M trở xuống, 4×10^{-10} M trở xuống, 3×10^{-10} M trở xuống, 2×10^{-10} M trở xuống, 1×10^{-10} M trở xuống. Giá trị KD của phân tử liên kết kháng nguyên lớn hơn có thể là, ví dụ, 1×10^{-8} M trở lên, 2×10^{-8} M trở lên, 3×10^{-8} M trở lên, 4×10^{-8} M trở lên, 5×10^{-8} M trở lên, 6×10^{-8} M trở lên, 7×10^{-8} M trở lên, 8×10^{-8} M trở lên, 9×10^{-8} M trở lên, 1×10^{-7} M trở lên, 2×10^{-7} M trở lên, 3×10^{-7} M trở lên, 4×10^{-7} M trở lên, 5×10^{-7} M trở lên, 6×10^{-7} M trở lên, 7×10^{-7} M trở lên, 8×10^{-7} M trở lên, 9×10^{-7} M trở lên, 1×10^{-6} M trở lên, 2×10^{-6} M trở lên, 3×10^{-6} M trở lên, 4×10^{-6} M trở lên, 5×10^{-6} M trở lên, 6×10^{-6} M trở lên, 7×10^{-6} M trở lên, 8×10^{-6} M trở lên, 9×10^{-6} M trở lên.

Theo một phương án khác, hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện bằng giá trị kd (hằng số tốc độ phân ly), thay vì giá trị KD.

Theo một phương án khác, hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện bằng lượng kháng nguyên mà đã liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên. Ví dụ, trong các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, lượng liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên được cố định trên chip cảm biến và lượng liên kết của kháng nguyên đã liên kết thêm vào đó, mỗi lượng được đo dưới dạng đơn vị cộng hưởng (RU). Hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng lượng liên kết của kháng nguyên thu được từ đó làm

chất chỉ thị, hoặc theo cách khác có thể được biểu thị bằng cách sử dụng giá trị thu được bằng cách chia lượng kháng nguyên được liên kết cho lượng phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết (tức là, lượng kháng nguyên được liên kết trên mỗi lượng đơn vị phân tử liên kết kháng nguyên) làm chất chỉ thị. Phương pháp cụ thể để đo và tính toán lượng liên kết sẽ được mô tả dưới đây trong các ví dụ. Theo một số phương án, khi lượng kháng nguyên được liên kết có mặt hợp chất phân tử nhỏ so với lượng kháng nguyên được liên kết khi không có hợp chất phân tử nhỏ, thì một giá trị lớn hơn giá trị còn lại. Theo một phương án khác, khi lượng kháng nguyên được liên kết khi có mặt nồng độ hợp chất phân tử nhỏ so với lượng kháng nguyên được liên kết khi có mặt nồng độ thấp hợp chất phân tử nhỏ, thì một giá trị lớn hơn giá trị còn lại. Theo các phương án khác, sự khác biệt về lượng liên kết của kháng nguyên là, ví dụ, hai lần trở lên, ba lần trở lên, năm lần trở lên, mười lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 200 lần trở lên, 300 lần trở lên, 500 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 2×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 5×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 2×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 5×10^4 lần trở lên, hoặc 1×10^5 lần trở lên. Lượng liên kết kháng nguyên có giá trị lớn hơn có thể là, ví dụ, 0,01 trở lên, 0,02 trở lên, 0,03 trở lên, 0,04 trở lên, 0,05 trở lên, 0,06 trở lên, 0,07 trở lên, 0,08 trở lên, 0,09 trở lên, 0,1 trở lên, 0,2 trở lên, 0,3 trở lên, 0,4 trở lên, 0,5 trở lên, 0,6 trở lên, 0,7 trở lên, 0,8 trở lên, 0,9 trở lên, 1 trở lên. Lượng liên kết kháng nguyên có giá trị thấp hơn có thể là, ví dụ, 0,5 trở xuống, 0,4 trở xuống, 0,3 trở xuống, 0,2 trở xuống, 0,1 trở xuống, 0,09 trở xuống, 0,08 trở xuống, 0,07 trở xuống, 0,06 trở xuống, 0,05 trở xuống, 0,04 trở xuống, 0,03 trở xuống, 0,02 trở xuống, 0,01 trở xuống, 0,009 trở xuống, 0,008 trở xuống, 0,007 trở xuống, 0,006 trở xuống, 0,005 trở xuống, 0,004 trở xuống, 0,003 trở xuống, 0,002 trở xuống, 0,001 trở xuống.

Theo một số phương án, các giá trị KD, giá trị kd, hoặc các giá trị lượng liên kết biểu hiện ở đây được đo hoặc được tính toán bằng cách thực hiện thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25 độ C hoặc 37 độ C (ví dụ, xem các ví dụ ở đây).

Nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ có thể được lựa chọn một cách tùy ý, miễn là sự khác biệt trong hoạt tính liên kết đối với phân tử liên kết kháng nguyên có thể được phát hiện. Theo các phương án nhất định, nồng độ cao bao gồm, ví dụ, 1 nM hoặc nồng độ cao hơn, 3 nM hoặc nồng độ cao hơn, 10 nM hoặc nồng độ cao hơn, 30 nM hoặc nồng độ cao hơn, 100 nM hoặc nồng độ cao hơn, 300 nM hoặc

nồng độ cao hơn, 1 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 3 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 10 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 30 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 100 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 300 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 1 mM hoặc nồng độ cao hơn, 3 mM hoặc nồng độ cao hơn, 10 mM hoặc nồng độ cao hơn, 30 mM hoặc nồng độ cao hơn, 100 mM hoặc nồng độ cao hơn, 300 mM hoặc nồng độ cao hơn, 1 M hoặc nồng độ cao hơn. Theo cách khác, nồng độ cao ở đây có thể là nồng độ đảm bảo đủ lượng để cho phép mỗi phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện hoạt tính liên kết tối đa. Theo một phương án, 1 micromol, 10 micromol, 100 micromol, 1 mM, hoặc lượng đủ để cho phép mỗi phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện hoạt tính liên kết tối đa có thể được lựa chọn làm nồng độ cao ở đây. Theo các phương án nhất định, nồng độ thấp bao gồm, ví dụ, 1 mM hoặc nồng độ thấp hơn, 300 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 100 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 30 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 10 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 3 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 1 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 300 nM hoặc nồng độ thấp hơn, 100 nM hoặc nồng độ thấp hơn, 30 nM hoặc nồng độ thấp hơn, 10 nM hoặc nồng độ thấp hơn, 3 nM hoặc nồng độ thấp hơn, 1 nM hoặc nồng độ thấp hơn, 300 pM hoặc nồng độ thấp hơn, 100 pM hoặc nồng độ thấp hơn, 30 pM hoặc nồng độ thấp hơn, 10 pM hoặc nồng độ thấp hơn, 3 pM hoặc nồng độ thấp hơn, 1 pM hoặc nồng độ thấp hơn, v.v. Theo cách khác, nồng độ thấp ở đây có thể là nồng độ mà ở đó mỗi phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện hoạt tính liên kết tối thiểu. Trường hợp nồng độ về căn bản là “không” (nghĩa là không có hợp chất phân tử nhỏ) có thể được chọn làm một phương án cho nồng độ thấp. Theo một phương án, 1 mM, 100 micromol, 10 micromol, 1 micromol, nồng độ mà tại đó mỗi phân tử liên kết với kháng nguyên cho thấy hoạt tính liên kết tối thiểu, hoặc sự vắng mặt của hợp chất phân tử nhỏ có thể được chọn làm nồng độ thấp ở đây. Theo một phương án khác, đối với tỷ lệ giữa nồng độ cao và nồng độ thấp, ví dụ, các giá trị 3 lần trở lên, 10 lần trở lên, 30 lần trở lên, 100 lần trở lên, 300 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 1×10^5 lần trở lên, 3×10^5 lần trở lên, 1×10^6 lần trở lên, 3×10^6 lần trở lên, 1×10^7 lần trở lên, 3×10^7 lần trở lên, 1×10^8 lần trở lên, 3×10^8 lần trở lên, 1×10^9 lần trở lên, 3×10^9 lần trở lên, 1×10^{10} lần trở lên, 3×10^{10} lần trở lên, 1×10^{11} lần trở lên, 3×10^{11} lần trở lên, 1×10^{12} lần trở lên có thể được lựa chọn.

Theo một phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế thể hiện tác dụng gây độc tế bào kháng lại các tế bào biểu hiện kháng nguyên của chúng. Khi tế bào đích biểu hiện kháng nguyên trên bề mặt của chúng và phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết với nó, tế bào có thể bị tổn thương. Tổn thương tế bào có thể là các tổn thương gây ra bởi các tế bào hiệu ứng, ví dụ tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và tác dụng thực bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), và có thể là các tổn thương gây ra bởi bổ thể, ví dụ tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Theo cách khác, tổn thương này có thể các tổn thương gây ra bởi chất gây độc tế bào (ví dụ, đồng vị phóng xạ hoặc các chất trị liệu hóa học) như ở các thể tiếp hợp miễn dịch. Tác dụng gây độc tế bào ở đây có thể bao gồm các hoạt động gây ra sự chết tế bào, các hoạt động ức chế sự tăng sinh tế bào, các hoạt động làm tổn thương chức năng tế bào, v.v. Khi có mặt đủ lượng phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tổn thương có thể gây ra số tế bào biểu hiện kháng nguyên là, ví dụ, 10% hoặc cao hơn, 15% hoặc cao hơn, 20% hoặc cao hơn, 25% hoặc cao hơn, 30% hoặc cao hơn, 35% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, 45% hoặc cao hơn, 50% hoặc cao hơn, 55% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, hoặc 95% hoặc cao hơn. Phép đo đối với hoạt tính gây độc tế bào có thể được thực hiện so với phép đo khi không có phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế hoặc khi có mặt phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng âm. Các thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào làm ví dụ được đề xuất ở đây.

Theo một phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế thể hiện hoạt tính trung hòa với kháng nguyên của chúng. Hoạt tính trung hòa nghĩa là hoạt động vô hiệu hóa (hoặc ức chế, phong bế) hoạt tính sinh học liên quan đến kháng nguyên. Theo một phương án, hoạt tính sinh học được tạo ra do liên kết giữa phối tử và thụ thể. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế ức chế liên kết giữa phối tử và thụ thể. Khi có mặt đủ lượng phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế, hoạt tính sinh học có thể bị ức chế, ví dụ, 10% hoặc cao hơn, 15% hoặc cao hơn, 20% hoặc cao hơn, 25% hoặc cao hơn, 30% hoặc cao hơn, 35% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, 45% hoặc cao hơn, 50% hoặc cao hơn, 55% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, hoặc 95% hoặc cao hơn. Phép đo đối với hoạt tính ức chế có thể được thực hiện so với

phép đo khi không có phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế hoặc khi có mặt phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng âm. Phương pháp cụ thể để đo hoạt tính trung hòa được đề xuất ở đây.

Theo một phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm vùng Fc. Theo các phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm vùng hằng định. Vùng hằng định có thể là vùng hằng định chuỗi nặng (chứa vùng Fc), vùng hằng định chuỗi nhẹ, hoặc cả hai. Theo một số phương án, vùng Fc là vùng có trình tự gốc. Các ví dụ về vùng hằng định chuỗi nặng có nguồn gốc từ các kháng thể trình tự tự nhiên bao gồm, ví dụ, các vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1 người (SEQ ID NO: 219), IgG2 người (SEQ ID NO: 220), IgG3 người (SEQ ID NO: 221), IgG4 người (SEQ ID NO: 222), v.v. Các ví dụ khác về vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm các vùng hằng định chuỗi nặng chẳng hạn như SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 217. Các ví dụ về vùng hằng định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ các kháng thể trình tự tự nhiên bao gồm, ví dụ, các vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuỗi kappa người (SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 218), chuỗi lambda người (SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 216), v.v.

Theo một phương án khác, vùng Fc có thể là vùng Fc biến đổi được chuẩn bị bằng cách đưa (các) biến đổi axit amin vào vùng Fc trình tự tự nhiên. Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến đổi có hoạt tính liên kết tăng cường với ít nhất một thụ thể Fc gamma được chọn từ nhóm bao gồm Fc gamma R1a, Fc gamma R1a, Fc gamma R1b, và Fc gamma R1c, so với vùng Fc trình tự tự nhiên.

Theo các phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế là các kháng thể. Theo các phương án nhất định, các kháng thể này là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người, hoặc kháng thể người. Theo một phương án, các kháng thể này là đoạn kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, diabody, hoặc đoạn F(ab')₂, v.v. Theo một phương án khác, các kháng thể này là kháng thể có độ dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1 nguyên vẹn, kháng thể IgG4 nguyên vẹn, hoặc lớp hoặc isotyp kháng thể khác được xác định ở đây.

Theo một phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế tạo thành phức hợp bậc ba cùng với hợp chất phân tử nhỏ và kháng nguyên. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể. Theo một phương

án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết với hợp chất phân tử nhỏ thông qua CDR1, CDR2, CDR3 chuỗi nặng. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có motip liên kết với hợp chất phân tử nhỏ. Motip liên kết với hợp chất phân tử nhỏ được tạo ra, ví dụ, từ ít nhất một axit amin có tại vị trí 33, vị trí 52, vị trí 52a, vị trí 53, vị trí 55, vị trí 56, vị trí 58, vị trí 95, vị trí 96, vị trí 98, vị trí 100a, vị trí 100b, vị trí 100c, theo cách đánh số Kabat. Theo các phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết với hợp chất phân tử nhỏ thông qua ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm vị trí 33, vị trí 52, vị trí 52a, vị trí 53, vị trí 55, vị trí 56, vị trí 58, vị trí 95, vị trí 96, vị trí 98, vị trí 100a, vị trí 100b, vị trí 100c, theo cách đánh số Kabat. Kháng nguyên còn có thể liên kết với phức hợp được tạo thành từ khả năng liên kết giữa phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và hợp chất phân tử nhỏ. Ngoài ra, hợp chất phân tử nhỏ có thể có ở mặt phân cách của tương tác giữa phân tử liên kết kháng nguyên và kháng nguyên và có thể liên kết với cả hai. Sự hình thành phức hợp bậc ba bởi phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế cùng với hợp chất phân tử nhỏ và kháng nguyên có thể được xác nhận, ví dụ, bằng phương pháp tinh thể học như được mô tả dưới đây hoặc các kỹ thuật tương tự. Theo các phương án nhất định, hợp chất phân tử nhỏ này là hợp chất chứa adenosin.

Theo một phương án, hợp chất phân tử nhỏ theo sáng chế là “hợp chất đặc hiệu mô đích”. Theo các phương án khác, “hợp chất đặc hiệu mô đích” là hợp chất đặc hiệu mô khối u. Các hợp chất đặc hiệu mô đích và các hợp chất đặc hiệu mô khối u điển hình được bộc lộ ở đây (ví dụ, “II. Các chế phẩm và phương pháp (phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận kháng CD137)”, “A. Các kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 điển hình”, “[hoạt tính liên kết phụ thuộc hợp chất phân tử nhỏ]”).

B. Kháng nguyên

Ở đây, “kháng nguyên” không bị giới hạn cụ thể về cấu trúc của chúng, miễn là chúng bao gồm các epitop mà phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết vào. Kháng nguyên có thể là chất vô cơ hoặc hữu cơ. Theo một số phương án, các ví dụ về kháng nguyên bao gồm: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-keto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, thụ thể adenosin A1, A33, ACE, ACE-2, activin, activin A, activin AB, activin B, activin C, activin RIA, activin RIA ALK-2, activin RIB

ALK-4, activin RIIA, activin RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, addressin, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alpha-1-antitrypsin, chất đối kháng alpha-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, artemin, kháng Id, ASPARTIC, atrial natriuretic peptit, av/b3 integrin, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, yếu tố kích thích lympho bào B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Osteogenin, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, bombesin, yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ xương, BPDE, BPDE-DNA, BTC, yếu tố bỏ thể 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, canxitonin, cAMP, kháng nguyên carcinoembryonic (CEA), kháng nguyên liên quan đến ung thư, cathepsin A, cathepsin B, cathepsin C/DPPI, cathepsin D, cathepsin E, cathepsin H, cathepsin L, cathepsin O, cathepsin S, cathepsin V, cathepsin X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (p67 protein), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, độc tố Botulinum, độc tố Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, PD1, PDL1, LAG3, TIM3, galectin-9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, kháng nguyên liên quan đến khối u xytokeratin, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, yếu tố điều hòa bỏ thể (yếu tố thúc đẩy phân rã), des

(1-3)-IGF-I (IGF-1 não), Dhh, digoxin, DNAM-1, Dnaza, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, yếu tố endothelin, enkephalinaza, eNOS, Eot, eotaxin 1, EpCAM, ephrin B2/EphB4, EPO, ERCC, E-selectin, ET-1, yếu tố IIa, yếu tố VII, yếu tố VIIIc, yếu tố IX, protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ferritin, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF-3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, fibrin, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormon kích thích nang, fractalkin, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (myostatin), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alpha1, GFR-alpha2, GFR-alpha3, GTR, glucagon, Glut4, glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, hormon giải phóng hormon tăng trưởng, hapten (NP-cap hoặc NIP-cap), HB-EGF, HCC, glycoprotein vỏ HCMV gB, glycoprotein vỏ HCMV gH, HCMV UL, yếu tố tăng trưởng tạo máu (HGF), Hep B gp120, heparanaza, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), virus herpes simplex (HSV) gB glycoprotein, HSV gD glycoprotein, HGFA, kháng nguyên liên quan đến ung thư hắc tố có khối lượng phân tử cao (HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 loop, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, myosin tim của người, cytomegalovirus của người (HCMV), hormon tăng trưởng của người (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, thụ thể IgA, IgE, IGF, protein liên kết IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-23, IL-27, interferon (INF)-alpha, INF-beta, INF-gamma, inhibin, iNOS, chuỗi insulin A, chuỗi insulin B, yếu tố tăng trưởng giống insulin 1, integrin alpha2, integrin alpha3, integrin alpha4, integrin alpha4/beta1, integrin alpha4/beta7, integrin alpha5 (alpha V), integrin alpha5/beta1, integrin alpha5/beta3, integrin alpha6, integrin beta1, integrin beta2, interferon gamma, IP-10, I-TAC, JE, kallikrein 2, kallikrein 5, kallikrein 6, kallikrein 11, kallikrein 12, kallikrein 14, kallikrein 15, kallikrein L1, kallikrein L2, kallikrein L3, kallikrein L4, KC, KDR, yếu tố tăng trưởng tế bào keratin (KGF), laminin 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), TGF-1 ản, TGF-1 bp1 ản, LBP, LDGF, LECT2, lefty, kháng nguyên Lewis-Y, kháng nguyên liên quan đến Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT,

lipoprotein, LIX, LKN, Lptn, L-selectin, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, bề mặt phổi, hormon tạo hoàng thể, thụ thể lymphotoxin beta, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEAZA, thụ thể MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alpha, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucin (Muc1), MUC18, chất ức chế Mullerian, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, yếu tố bám N-C, NCA 90, NCAM, NCAM, neprilysin, neurotrophin-3, -4, hoặc -6, neurturin, yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormon parathyroid, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-cadherin, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, placental alkaline phosphatase (PLAP), PIGF, PLP, PP14, proinsulin, prorelaxin, protein C, PS, PSA, PSCA, kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, chuỗi relaxin A, chuỗi relaxin B, renin, virus hợp bào hô hấp (RSV) F, RSV Fgp, Ret, yếu tố Rheumatoid, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, albumin huyết tương, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glycoprotein liên kết khối u-72), TARC, TCA-3, thụ thể tế bào T (ví dụ, thụ thể tế bào T alpha/beta), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, alkaline phosphatase tương tự testis PLAP, Tfr, TGF, TGF-alpha, TGF-beta, TGF-beta Pan đặc hiệu, TGF-betaRI (ALK-5), TGF-betaRII, TGF-betaRIIb, TGF-betaRIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, thrombin, thymus Ck-1, hormon kích thích tuyến giáp, Tie, TIMP, TIQ, yếu tố mô, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alpha, TNF-alphabeta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUND), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ,

TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (phối tử TRAIL Apo-2, TL2), TNFSF11 (phối tử TRANCE/RANK ODF, phối tử OPG), TNFSF12 (phối tử TWEAK Apo-3, phối tử DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (phối tử LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (phối tử GITR phối tử AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectin, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (phối tử OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (phối tử CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (phối tử Fas phối tử Apo-1, phối tử APT1), TNFSF7 (phối tử CD27 CD70), TNFSF8 (phối tử CD30 CD153), TNFSF9 (phối tử 4-1BB phối tử CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, thụ thể transferrin, TRF, Trk, TROP-2, TLR1 (thụ thể tương tự Toll 1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TSG, TSLP, kháng nguyên liên kết khối u CA125, kháng nguyên liên kết khối u biểu hiện cacbonhydrat liên quan đến Lewis-Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, urokinaza, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherin, VE-cadherin-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, kháng nguyên virus, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR integrin, yếu tố von Willebrand, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, A beta, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, LDL bị oxy hóa, PCSK9, prekallikrein, RON, TMEM16F, SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B, tau, VAP1, kininogen có khối lượng phân tử lớn, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, yếu tố B, yếu tố D, yếu tố H, properdin, sclerostin, fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, yếu tố mô, yếu tố V,

yếu tố Va, yếu tố VII, yếu tố VIIa, yếu tố VIII, yếu tố VIIa, yếu tố IX, yếu tố IXa, yếu tố X, yếu tố Xa, yếu tố XI, yếu tố XIa, yếu tố XII, yếu tố XIIa, yếu tố XIII, yếu tố XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, thrombomodulin, TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2, GPC3, Syndecan-1, Syndecan-2, Syndecan-3, Syndecan-4, LPA, và S1P. Theo một số phương án, các ví dụ về kháng nguyên bao gồm các thụ thể đối với các yếu tố tăng trưởng và hormon. Theo các phương án nhất định, kháng nguyên là các kháng nguyên được biểu hiện trong hoặc được tiết từ các tế bào có trong mô khối u (ví dụ, các tế bào khối u, các tế bào miễn dịch, tế bào đệm, hoặc tương tự).

C. Các hoạt tính, chế phẩm, và phương pháp

Theo một phương án, hoạt tính gây độc tế bào theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), tác dụng thực bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và hoạt tính gây độc tế bào bởi các tế bào T. Hoạt tính CDC dùng để chỉ hoạt tính gây độc tế bào bởi hệ thống bổ thể. Mặt khác, hoạt tính ADCC dùng để chỉ hoạt tính gây tổn thương các tế bào đích thông qua các tế bào hiệu ứng, xảy ra khi phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên có trên bề mặt tế bào của các tế bào đích và các tế bào hiệu ứng còn liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên. Dù phân tử liên kết kháng nguyên quan tâm có hoạt tính ADCC hay nó có hoạt tính CDC có thể được đo bằng các phương pháp đã biết (ví dụ, Current Protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, Coligan et al., (1993)).

Theo một phương án, “hoạt tính trung hòa” theo sáng chế dùng để chỉ hoạt tính của phân tử liên kết kháng nguyên để ức chế hoạt tính sinh học thông qua liên kết của nó với phân tử tham gia vào hoạt tính sinh học của nó. Theo một số phương án, hoạt tính sinh học được tạo ra do liên kết giữa phối tử và thụ thể. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với phối tử hoặc thụ thể, do đó ức chế liên kết giữa phối tử và thụ thể. Khi phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính trung hòa này được gọi là kháng thể trung hòa. Hoạt tính trung hòa của chất thử nghiệm có thể được đo bằng cách so sánh hoạt tính sinh học khi có mặt phối tử giữa các điều kiện khi có hoặc không có chất thử nghiệm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào nồng độ hợp chất. Khi hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô đích, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên sử dụng hoạt tính của nó một cách đặc hiệu trong mô đích. Theo các phương án nhất định, mô đích này là mô khối u. Khi hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô khối u, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên để sử dụng trong điều trị khối u. Theo một số khía cạnh, các phương pháp sản xuất này bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất khác với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi không có hợp chất. Theo một số khía cạnh, các phương pháp sản xuất này bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao khác với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi có hợp chất ở nồng độ thấp. Theo một số phương án, các phương pháp sản xuất này bao gồm các bước (a) thu được hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất, (b) thu được hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất, và (c) chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất khác với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi không có hợp chất. Theo một số phương án, các phương pháp sản xuất này bao gồm các bước (a) thu được hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao, (b) thu được hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp, và (c) chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao khác với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên mà hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng lên khi nồng độ hợp chất cao hơn. Theo cách khác, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên giảm xuống khi nồng độ hợp chất cao hơn. Phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất cao hơn hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi không có hợp chất. Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết

kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất thấp hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất. Theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi không có hợp chất cao hơn hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi có mặt hợp chất. Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất thấp hơn hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi không có hợp chất. Theo khía cạnh khác, các phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao là cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp. Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp là thấp hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao. Theo một khía cạnh khác, phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp là cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao. Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất ở nồng độ cao là thấp hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có đặc tính duy trì cao trong huyết tương. Theo một số phương án, phương pháp sản xuất bao gồm bước sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất cao hơn. Theo các phương án khác, phương pháp sản xuất bao gồm các bước (a) tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất cao hơn; và (b) đo đặc tính duy trì trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên được tạo ra ở bước (a). Theo các phương án nhất định, hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô đích. Theo các phương án khác, hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô khối u. Có thể xác định xem phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có đặc tính duy trì cao trong huyết tương bằng cách so sánh với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết

kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất đặc hiệu mô đích cao hơn có đặc tính duy trì trong huyết tương cao hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên mà sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất và khi không có hợp chất là, ví dụ, 2 lần trở xuống, 1,8 lần trở xuống, 1,5 lần trở xuống, 1,3 lần trở xuống, 1,2 lần trở xuống, hoặc 1,1 lần trở xuống. Xét về việc thực hiện so sánh, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng khi có mặt lượng đủ hợp chất về căn bản là giống nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp. Theo một số phương án, phương pháp sản xuất bao gồm bước sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất cao hơn. Theo các phương án khác, phương pháp sản xuất bao gồm các bước (a) tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất cao hơn; và (b) đo khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương đối với phân tử liên kết kháng nguyên được tạo ra ở bước (a). Theo các phương án nhất định, hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô đích. Theo các phương án khác, hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô khối u. Có thể xác định xem phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp bằng cách so sánh với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất đặc hiệu mô đích cao hơn có khả năng tích tụ kháng nguyên trong huyết tương thấp hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên mà sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất và khi không có hợp chất là, ví dụ, 2 lần trở xuống, 1,8 lần trở xuống, 1,5 lần trở xuống, 1,3 lần trở xuống, 1,2

lần trở xuống, hoặc 1,1 lần trở xuống. Xét về việc thực hiện so sánh, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng khi có mặt lượng đủ hợp chất về căn bản là giống nhau.

Theo một số phương án, đối với phân tử liên kết kháng nguyên tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế, sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất là, ví dụ, hai lần trở lên, ba lần trở lên, năm lần trở lên, 10 lần trở lên, 20 lần trở lên, 30 lần trở lên, 50 lần trở lên, 100 lần trở lên, 200 lần trở lên, 300 lần trở lên, 500 lần trở lên, 1×10^3 lần trở lên, 2×10^3 lần trở lên, 3×10^3 lần trở lên, 5×10^3 lần trở lên, 1×10^4 lần trở lên, 2×10^4 lần trở lên, 3×10^4 lần trở lên, 5×10^4 lần trở lên, hoặc 1×10^5 lần trở lên.

Theo một số phương án, hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện bằng giá trị KD (hằng số phân ly) hoặc bằng giá trị kd (hằng số tốc độ phân ly). Theo cách khác, nó có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng lượng kháng nguyên mà đã liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên như được mô tả ở trên. Theo cách khác, theo một phương án khác, hoạt tính gây độc tế bào hoặc hoạt tính trung hòa của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng làm chất chỉ thị thay thế cho hoạt tính liên kết kháng nguyên.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính liên kết kháng nguyên cao hơn bao gồm, ví dụ, giá trị KD là 9×10^{-7} M trở xuống, 8×10^{-7} M trở xuống, 7×10^{-7} M trở xuống, 6×10^{-7} M trở xuống, 5×10^{-7} M trở xuống, 4×10^{-7} M trở xuống, 3×10^{-7} M trở xuống, 2×10^{-7} M trở xuống, 1×10^{-7} M trở xuống, 9×10^{-8} M trở xuống, 8×10^{-8} M trở xuống, 7×10^{-8} M trở xuống, 6×10^{-8} M trở xuống, 5×10^{-8} M trở xuống, 4×10^{-8} M trở xuống, 3×10^{-8} M trở xuống, 2×10^{-8} M trở xuống, 1×10^{-8} M trở xuống, 9×10^{-9} M trở xuống, 8×10^{-9} M trở xuống, 7×10^{-9} M trở xuống, 6×10^{-9} M trở xuống, 5×10^{-9} M trở xuống, 4×10^{-9} M trở xuống, 3×10^{-9} M trở xuống, 2×10^{-9} M trở xuống, 1×10^{-9} M trở xuống, hoặc, ví dụ, lượng kháng nguyên được liên kết là 0,01 hoặc cao hơn, 0,02 hoặc cao hơn, 0,03 hoặc cao hơn, 0,04 hoặc cao hơn, 0,05 hoặc cao hơn, 0,06 hoặc cao hơn, 0,07 hoặc cao hơn, 0,08 hoặc cao hơn, 0,09 hoặc cao hơn, 0,1 hoặc cao hơn, 0,2 hoặc cao hơn, 0,3 hoặc cao hơn, 0,4 hoặc cao hơn, 0,5 hoặc cao hơn, 0,6 hoặc cao hơn, 0,7 hoặc cao hơn, 0,8 hoặc cao hơn, 0,9 hoặc cao hơn, 1 hoặc cao hơn.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính liên kết kháng nguyên thấp hơn bao gồm, ví dụ, giá trị KD là 1×10^{-8} M trở lên, 2×10^{-8} M trở lên, 3×10^{-8} M trở lên, 4×10^{-8} M trở lên, 5×10^{-8} M trở lên, 6×10^{-8} M trở lên, 7×10^{-8} M trở lên, 8×10^{-8} M trở lên, 9×10^{-8} M trở lên, 1×10^{-7} M trở lên, 2×10^{-7} M trở lên, 3×10^{-7} M trở lên, 4×10^{-7} M trở lên, 5×10^{-7} M trở lên, 6×10^{-7} M trở lên, 7×10^{-7} M trở lên, 8×10^{-7} M trở lên, 9×10^{-7} M trở lên, 1×10^{-6} M trở lên, 2×10^{-6} M trở lên, 3×10^{-6} M trở lên, 4×10^{-6} M trở lên, 5×10^{-6} M trở lên, 6×10^{-6} M trở lên, 7×10^{-6} M trở lên, 8×10^{-6} M trở lên, 9×10^{-6} M trở lên, hoặc, ví dụ, lượng kháng nguyên được liên kết là 0,5 hoặc thấp hơn, 0,4 hoặc thấp hơn, 0,3 hoặc thấp hơn, 0,2 hoặc thấp hơn, 0,1 hoặc thấp hơn, 0,09 hoặc thấp hơn, 0,08 hoặc thấp hơn, 0,07 hoặc thấp hơn, 0,06 hoặc thấp hơn, 0,05 hoặc thấp hơn, 0,04 hoặc thấp hơn, 0,03 hoặc thấp hơn, 0,02 hoặc thấp hơn, 0,01 hoặc thấp hơn, 0,009 hoặc thấp hơn, 0,008 hoặc thấp hơn, 0,007 hoặc thấp hơn, 0,006 hoặc thấp hơn, 0,005 hoặc thấp hơn, 0,004 hoặc thấp hơn, 0,003 hoặc thấp hơn, 0,002 hoặc thấp hơn, 0,001 hoặc thấp hơn.

Nồng độ của hợp chất có thể được lựa chọn một cách tùy ý, miễn là sự khác biệt về hoạt tính liên kết đối với phân tử liên kết kháng nguyên có thể được phát hiện. Các ví dụ về nồng độ (nồng độ cao và nồng độ thấp) được đề xuất ở đây. Theo các phương án nhất định, các ví dụ về nồng độ cao bao gồm, ví dụ, 1 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 3 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 10 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 30 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 100 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 300 micromol hoặc nồng độ cao hơn, 1 mM hoặc nồng độ cao hơn. Theo cách khác, nồng độ cao ở đây có thể là nồng độ đảm bảo đủ lượng để cho phép mỗi phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện hoạt tính liên kết tối đa. Theo các phương án nhất định, các ví dụ về nồng độ thấp bao gồm, ví dụ, 1 mM hoặc nồng độ thấp hơn, 300 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 100 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 30 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 10 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 3 micromol hoặc nồng độ thấp hơn, 1 micromol hoặc nồng độ thấp hơn. Theo cách khác, nồng độ thấp ở đây có thể là nồng độ mà ở đó mỗi phân tử liên kết kháng nguyên thể hiện hoạt tính liên kết tối thiểu. Trường hợp về căn bản nồng độ là "không" (tức là, không có hợp chất) có thể một phương án về nồng độ thấp.

Theo một số khía cạnh, các phương pháp sản xuất này bao gồm bước chọn lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất khác với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi không có hợp chất, từ

thư viện phân tử liên kết kháng nguyên. Thư viện phân tử liên kết kháng nguyên có thể là nguồn phân tử liên kết kháng nguyên không phân cực (thư viện chưa qua xử lý) hoặc có thể là nguồn phân tử liên kết kháng nguyên phân cực. Các ví dụ về thư viện là nguồn phân tử liên kết kháng nguyên phân cực bao gồm thư viện phân tử liên kết kháng nguyên mà hoạt tính liên kết với hợp chất đặc hiệu được quy định trước đó. Theo các phương án nhất định, thư viện phân tử liên kết kháng nguyên là thư viện của phân tử liên kết kháng nguyên mà (các) biến đổi axit amin để tạo ra hoạt tính liên kết với hợp chất đặc hiệu được đưa vào trước đó. Các ví dụ về loại thư viện này bao gồm các thư viện đã được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn Quốc tế số, WO 2015/083764.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp sản xuất còn bao gồm các bước (d) thu được axit nucleic mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên được chọn từ bước (c), (e) đưa axit nucleic ở bước (d) vào tế bào chủ, và (f) nuôi cấy tế bào chủ ở bước (e) để phân tử liên kết kháng nguyên được biểu hiện. Axit nucleic của bước (d) có thể là một hoặc nhiều axit nucleic và có thể bao gồm trong một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện). Theo các phương án nhất định, các phương pháp sản xuất còn bao gồm bước (g) phục hồi phân tử liên kết kháng nguyên từ môi trường nuôi cấy tế bào ở bước (f).

Phân tử liên kết kháng nguyên tạo ra bởi các phương pháp sản xuất theo sáng chế cũng được bao gồm theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây. Theo một phương án, được phẩm nêu trên còn bao gồm chất mang được dụng. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để sử dụng trong điều trị khối u.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất được phẩm, bao gồm bước trộn phân tử liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây với chất mang được dụng. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất được phẩm để sử dụng trong điều trị khối u.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây, khi sử dụng cho cơ thể sống, thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên trong mô khối u mạnh hơn trong mô không phải khối u. Không cần quan sát sự khác biệt trong việc đáp ứng đối với mỗi liều phân tử liên kết kháng nguyên, và chỉ cần quan sát sự khác

biệt đối với các phạm vi liều cụ thể là đủ. Theo một phương án khác, các tế bào được gắn đích (các tế bào biểu hiện kháng nguyên) bị tổn thương trong mô khối u mạnh hơn trong mô không phải khối u. Theo một phương án khác, các tế bào được gắn đích bị tổn thương ở liều trong mô khối u thấp hơn so với liều trong mô không phải khối u. Theo cách khác, theo một phương án khác, hiệu quả điều trị được quan sát ở liều thấp hơn so với liều mà quan sát được tác dụng phụ. Hiệu quả điều trị ở đây là sự phát triển của tác dụng kháng u (ví dụ, sự thoái biến khối u, gây ra sự chết tế bào với các tế bào khối u, hoặc ức chế sự tăng sinh của các tế bào khối u, v.v.) và tác dụng phụ là xuất hiện vấn đề bất lợi ở các mô bình thường (ví dụ, tổn thương tới các mô bình thường).

Theo một phương án, mức độ hiệu quả của thuốc do phân tử liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây mang lại khác nhau phụ thuộc vào việc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên có phụ thuộc vào nồng độ hợp chất (tức là, sự thay đổi theo nồng độ hợp chất) hay không. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế là phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tăng khi nồng độ hợp chất cao hơn. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng là phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất. Theo các phương án nhất định, hợp chất này là hợp chất đặc hiệu mô khối u. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên không có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ hợp chất nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên mà sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất và khi không có hợp chất là, ví dụ, 2 lần trở xuống, 1,8 lần trở xuống, 1,5 lần trở xuống, 1,3 lần trở xuống, 1,2 lần trở xuống, hoặc 1,1 lần trở xuống. Tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng khi có mặt đủ lượng hợp chất về căn bản là giống nhau.

Theo một phương án, đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng, các tác dụng của thuốc được tạo ra từ chúng là khác nhau. Theo phương án nhất định, các tác dụng của thuốc là khác nhau ở mô nơi mà nồng độ hợp chất thấp. Các ví dụ về mô với hợp chất ở nồng độ thấp bao gồm mô không phải khối u chẳng hạn như các mô bình thường. Phân tử liên kết kháng nguyên có thể được đề xuất ở dạng dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng

nguyên. Theo một số phương án, ở mô có hợp chất ở nồng độ thấp, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính làm tổn thương tế bào được gắn đích (tế bào biểu hiện kháng nguyên) thấp hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, ở mô có hợp chất ở nồng độ thấp, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế đòi hỏi liều cao hơn để gây tổn thương tế bào so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, ở mô có hợp chất ở nồng độ thấp, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế thể hiện mức độ tác dụng phụ thấp hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, ở mô có hợp chất ở nồng độ thấp, liều mà ở đó tác dụng phụ quan sát được đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế là cao hơn so với phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Các sự khác biệt về đáp ứng này không cần quan sát ở mọi mô (ví dụ, tất cả các mô thể hiện nồng độ thấp của hợp chất), và chỉ cần quan sát sự khác biệt ở một số mô là đủ. Theo các phương án nhất định, tác dụng phụ là vấn đề bất lợi ở các mô bình thường (ví dụ, tổn thương ở các mô bình thường).

Theo một phương án, đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng, các tác dụng của thuốc được tạo ra từ chúng về căn bản là giống nhau. Theo các phương án nhất định, các tác dụng của thuốc về căn bản là giống nhau ở mô nơi mà nồng độ hợp chất cao. Các ví dụ về mô với hợp chất ở nồng độ cao bao gồm mô khối u. Phân tử liên kết kháng nguyên có thể được đề xuất ở dạng được phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên. Theo một số phương án, ở mô với hợp chất ở nồng độ cao, hoạt tính gây tổn thương tế bào được gắn đích (tế bào biểu hiện kháng nguyên) về căn bản là giống nhau đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, ở mô với hợp chất ở nồng độ cao, liều yêu cầu để gây tổn thương tế bào về căn bản là giống nhau đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, ở mô với hợp chất ở nồng độ cao, mức độ hiệu quả điều trị về căn bản là giống nhau đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo một số phương án, ở mô với hợp chất ở nồng độ cao, liều mà ở đó hiệu quả điều trị được quan sát về căn bản là giống nhau đối với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên đối chứng. Theo các phương án nhất định, hiệu quả điều trị này là tác dụng kháng u (ví dụ, sự

thoái biến khối u, gây ra sự chết tế bào với các tế bào khối u, hoặc ức chế sự tăng sinh của các tế bào khối u, v.v.).

Theo khía cạnh khác, phân tử liên kết kháng nguyên để sử dụng làm thuốc được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phân tử liên kết kháng nguyên để sử dụng trong điều trị khối u được đề xuất. Theo khía cạnh khác, việc sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên trong quy trình sản xuất thuốc được đề xuất. Theo khía cạnh khác, việc sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên để điều trị khối u được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phương pháp điều trị khối u bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu phân tử liên kết kháng nguyên cho cá thể có khối u được đề xuất. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong các phương án nêu trên tốt hơn là người.

Phương pháp đo nồng độ ATP

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp đo nồng độ ATP trong dung dịch. Theo một số phương án, các phương pháp nêu trên bao gồm các bước (a) cho tế bào Luc/HEK293 phân chia biểu hiện thụ thể P2Y tiếp xúc với dung dịch, và (b) đo hoạt tính luciferaza trong tế bào. Thụ thể P2Y là thụ thể bề mặt tế bào, và thụ thể bắt cặp với protein G (GPCR) bẫy xuyên màng, có phối tử nội sinh là purin nucleotit ngoại bào (ATP, ADP), nucleotit pyrimidin (UTP, UDP), nucleotit đường, và tương tự như vậy. Theo các phương án khác, thụ thể P2Y này là P2Y1 (số đăng ký U42029), P2Y2 (số đăng ký U07225), P2Y4 (số đăng ký X91852), P2Y6 (số đăng ký X97058), P2Y11 (số đăng ký AF030335), P2Y12 (số đăng ký AJ320495), P2Y13 (số đăng ký AF295368), hoặc P2Y14 (số đăng ký D13626). Theo các phương án nhất định, thụ thể P2Y này là P2Y11 (số đăng ký AF030335). Tế bào Luc/HEK293 phân chia là các tế bào tái tổ hợp được chuẩn bị bằng cách sử dụng kỹ thuật luciferaza phân chia của ProbeX (Misawa et al., Anal. Chem. (2010) 82, 2552-2560), và biểu hiện hai protein sau đây: (i) protein dung hợp trong đó đoạn tận cùng C trong số hai đoạn của phân tử luciferaza tách thành hai được gắn vào tận cùng C của thụ thể P2Y, và (ii) protein dung hợp trong đó đoạn tận cùng N trong số hai đoạn của phân tử luciferaza phân chia thành hai được gắn vào tận cùng N của beta-arrestin (số đăng ký NM_004313).

Khi ATP được bổ sung vào các tế bào Luc/HEK293 phân chia biểu hiện thụ thể P2Y, tương tác giữa thụ thể P2Y và beta-arrestin xảy ra gần màng tế bào, và kết quả là đoạn luciferaza phân chia liên kết để hoàn nguyên phân tử luciferaza hoạt

động trong tế bào. Hoạt tính luciferaza có thể được đo bằng cách sử dụng chất nền luciferaza chẳng hạn như, ví dụ, luciferin. Theo một số phương án, phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với dung dịch chứa chất nền luciferaza. Dung dịch chứa chất nền luciferaza có thể được cho tiếp xúc với tế bào trước bước (a) hoặc sau bước (a).

Theo một số phương án, dung dịch mà nồng độ ATP được đo có thể là dung dịch *in vitro* hoặc dịch thể ở mô *in vivo*. Theo các phương án khác, dịch thể có thể được chọn từ nhóm bao gồm máu, dịch bạch huyết, dịch mô (dịch giữa mô, dịch gian bào, dịch kẽ bào), dịch khoang cơ thể (dịch khoang huyết thanh, dịch màng phổi, dịch cổ trướng, dịch màng tim), dịch não tủy (dịch tủy), dịch khớp (hoạt dịch), và thủy dịch (hydrotoid). Theo các phương án nhất định, dịch thể này là dịch gian bào. Theo một phương án khác, mô có thể mô khỏe mạnh/mô bình thường, và có thể mô bị bệnh (ví dụ, mô khối u). Theo một phương án, khi phương pháp được mô tả ở trên đo nồng độ ATP trong dịch thể trong mô *in vivo*, bước (i) có thể là bước cấy tế bào Luc/HEK293 phân chia biểu hiện thụ thể P2Y trong mô *in vivo*.

Theo một số phương án, hoạt tính luciferaza có thể được đo bằng cách phát hiện ánh sáng được phát ra khi luciferaza phản ứng với chất nền của nó chẳng hạn như luciferin. Trong trường hợp dung dịch này là dung dịch *in vitro*, sự phát quang này có thể được đo bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện sự phát quang chẳng hạn như thiết bị đọc đĩa. Trong trường hợp dung dịch này là dịch thể trong mô *in vivo*, độ phát quang có thể được đo bằng cách sử dụng thiết bị hình ảnh phát quang *in vivo* và tương tự như vậy. Việc định lượng dựa trên các phép đo có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách đo các dung dịch chứa nồng độ ATP đã biết và chuẩn bị đường cong chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ ATP và cường độ phát quang.

V. Các phương pháp sàng lọc

(1) Phương pháp sàng lọc miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử, sử dụng các kháng nguyên đa trị

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc có hiệu quả cao và độ chính xác cao để, xác định, và thu được miền liên kết kháng nguyên hoặc

phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử, sử dụng phân tử dung hợp thu được bằng cách dung hợp hai hoặc nhiều phân tử (hai hoặc nhiều đơn vị) của kháng nguyên với một phân tử (một đơn vị) của phân tử đối tác dung hợp.

Theo một khía cạnh, trong phương pháp theo sáng chế, phương pháp sàng lọc miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử, bao gồm:

(a) cho miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên hoặc thư viện của miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ tiếp xúc với phân tử dung hợp trong đó hai hoặc nhiều đơn vị kháng nguyên được dung hợp với một đơn vị đối tác dung hợp,

(b) thay thế miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên trong phân tử dung hợp trong bước (a) khi không có, hoặc có mặt các hợp chất với nồng độ thấp, và

(c) bước phân lập miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b).

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, phân tử đối tác dung hợp mà hai hoặc nhiều phân tử (hai hoặc nhiều đơn vị) của kháng nguyên được dung hợp là vùng Fc dime.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, vùng Fc bao gồm tiểu đơn vị Fc thứ nhất và tiểu đơn vị Fc thứ hai, và một kháng nguyên được dung hợp với mỗi trong số tiểu đơn vị Fc thứ nhất và thứ hai.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, một trong số các kháng nguyên được dung hợp với tận cùng N của mỗi tiểu trong số đơn vị Fc thứ nhất và thứ hai.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, thư viện của các miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên là thư viện thể thực khuẩn.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, các thể thực khuẩn được bao gồm trong thư viện thể thực khuẩn là các thể thực khuẩn trình diện trên bề

mặt của hai hoặc nhiều miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, các thể thực khuẩn được bao gồm trong thư viện thể thực khuẩn là các thể thực khuẩn có thiếu hụt trong gen PIII có nguồn gốc từ thể thực khuẩn phụ.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, kháng nguyên có thể là kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở trên, và các ví dụ này có thể bao gồm các loại “kháng nguyên” khác nhau được mô tả trong “IV. Các phương pháp và chế phẩm (phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết với kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào nồng độ của hợp chất phân tử nhỏ)”, “B. Kháng nguyên”). Theo một phương án, đối với kháng nguyên, kháng nguyên dạng màng (ví dụ, phân tử đồng kích thích chẳng hạn như CD137, CTLA4, CD40, OX40, RANK, GITR, và ICOS) có thể được ưu tiên sử dụng.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, sự dung hợp giữa vùng Fc (tiểu đơn vị Fc) và kháng nguyên có thể được tạo ra bởi các phương pháp thông thường bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền như được mô tả ở trên.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, đối với hợp chất phân tử nhỏ, các hợp chất khác nhau như được mô tả ở trên (ví dụ, các hợp chất đặc hiệu mô khối u chẳng hạn như nucleosit có cấu trúc vòng purin chẳng hạn như adenosin (ADO), adenosin triphosphat (ATP), adenosin diphosphat (ADP), adenosin monophosphat (AMP), inosin, và cả, ADPbetaS có sẵn trên thị trường (được sản xuất bởi Sigma); các axit amin chẳng hạn như alanin, axit glutamic, và axit aspartic; chất chuyển hóa của axit amin chẳng hạn như kynurenin, axit anthranilic, 3-hydroxykynurenin, và axit kynurenin; chất chuyển hóa của axit arachidonic chẳng hạn như prostaglandin E2; chất chuyển hóa sơ cấp của con đường phân hoặc chu trình Krebs chẳng hạn như axit lactic, axit succinic, và axit citric; và chất chuyển hóa nicotinamid chẳng hạn như 1-metyl nicotinamid) có thể được sử dụng.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, bước cho kháng nguyên (ví dụ, phân tử dung hợp của vùng Fc và kháng nguyên) tiếp xúc với thư viện thể thực khuẩn của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên, bước phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên, thử nghiệm của miền liên kết kháng

nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập khi có mặt hoặc không có hợp chất phân tử nhỏ có thể được thực hiện theo phương pháp được mô tả ở trên và phương pháp được mô tả dưới đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, đề cập đến các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật được đề cập của sáng chế.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2.

(2) Phương pháp sàng lọc miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hai hoặc nhiều hợp chất phân tử nhỏ khác nhau

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hai hoặc nhiều hợp chất phân tử nhỏ khác nhau.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

(a) cho miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên hoặc thư viện của các miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ thứ nhất,

(b) đặt miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất thứ nhất ở nồng độ thấp, và

(c) phân lập miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b),

(d) cho miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập trong bước (c) tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ thứ hai,

(e) đặt miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên trong bước (d) khi không có, hoặc khi có mặt hợp chất thứ hai ở nồng độ thấp, và,

(f) phân lập miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (e),

trong đó phương pháp này không bao gồm, giữa các bước (c) và (d), bước khuếch đại gen mã hóa miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập trong bước (c).

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, thư viện của các miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên là thư viện thể thực khuẩn.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, kháng nguyên này có thể là kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở trên, tốt hơn là kháng nguyên dạng màng (ví dụ, phân tử đồng kích thích chẳng hạn như CD137, CTLA4, CD40, OX40, RANK, GITR, và ICOS).

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, đối với hợp chất phân tử nhỏ, có thể sử dụng các hợp chất khác nhau được mô tả ở trên (ví dụ, các hợp chất đặc hiệu mô khối u chẳng hạn như nucleosit có cấu trúc vòng purin chẳng hạn như adenosin (ADO), adenosin triphosphat (ATP), adenosin diphosphat (ADP), adenosin monophosphat (AMP), và inosin; axit amin chẳng hạn như alanin, axit glutamic, và axit aspartic; chất chuyển hóa của axit amin chẳng hạn như kynurenin, axit anthranilic, 3-hydroxykynurenin, và axit kynurenic; chất chuyển hóa của axit arachidonic chẳng hạn như prostaglandin E2; chất chuyển hóa sơ cấp của con đường đường phân hoặc chu trình Krebs chẳng hạn như axit lactic, axit succinic, và axit citric; và chất chuyển hóa nicotinamid chẳng hạn như 1-metyl nicotinamid).

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, hợp chất phân tử nhỏ thứ nhất và hợp chất phân tử nhỏ thứ hai có thể là hai loại hợp chất khác nhau bất kỳ được chọn từ các hợp chất phân tử nhỏ khác nhau nêu trên.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, bước cho kháng nguyên tiếp xúc với thư viện thể thực khuẩn của các miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên, bước phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên, thử nghiệm của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập khi có mặt hoặc không có hợp chất phân tử nhỏ thứ nhất, và thử nghiệm khi có mặt hoặc không có hợp chất phân tử nhỏ thứ hai có thể được thực hiện theo phương pháp được mô tả ở trên và phương pháp được mô tả dưới đây trong phần Ví dụ thực

hiện sáng chế, đề cập đến các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật được đề cập của sáng chế.

Theo một phương án, đối với phương pháp theo sáng chế, phương pháp được mô tả trong Ví dụ 9 có thể được sử dụng.

(3) Phương pháp sàng lọc miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, sử dụng thư viện chưa qua xử lý

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào hợp chất phân tử nhỏ, sử dụng thư viện chưa qua xử lý chứa nhiều miễn liên kết kháng nguyên trình diện thể thực khuẩn hoặc phân tử liên kết kháng nguyên (ví dụ, miễn Fab) của các trình tự kháng thể người khác nhau được tạo ra từ lympho bào của người (ví dụ, PBMC của người) mà không tiếp nhận sự kích thích kháng nguyên.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

(a) cho thư viện chưa qua xử lý của các miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với kháng nguyên khi có mặt hợp chất phân tử nhỏ,

(b) đặt miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở bước (a) khi không có mặt, hoặc khi có mặt hợp chất ở nồng độ thấp, và

(c) phân lập miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được tách ra ở bước (b).

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, thư viện chưa qua xử lý này là thư viện thể thực khuẩn chứa các thể thực khuẩn trình diện trên bề mặt của hai hoặc nhiều miễn liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, thư viện chưa qua xử lý này là thư viện chứa các thể thực khuẩn có sự thiếu hụt trong gen PIII có nguồn gốc từ thể thực khuẩn phụ.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, thư viện chưa qua xử lý này là thư viện chứa các thể thực khuẩn được chuẩn bị bằng cách làm tăng biểu hiện của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên với chất phụ gia phân tử nhỏ mà làm tăng mức độ biểu hiện từ trình tự khởi đầu điều hòa biểu hiện của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, chất phụ gia phân tử nhỏ này là isopropyl- β -thiogalactopyranosit (IPTG) hoặc arabinoza.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, kháng nguyên này có thể là kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở trên, tốt hơn là kháng nguyên dạng màng (ví dụ, phân tử đồng kích thích chẳng hạn như CD137, CTLA4, CD40, OX40, RANK, GITR, và ICOS).

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, đối với hợp chất phân tử nhỏ, các hợp chất khác nhau được mô tả ở trên (ví dụ, các hợp chất đặc hiệu mô khối u chẳng hạn như nucleosit có cấu trúc vòng purin chẳng hạn như adenosin (ADO), adenosin triphosphat (ATP), adenosin diphosphat (ADP), adenosin monophosphat (AMP), và inosin; các axit amin chẳng hạn như alanin, axit glutamic, và axit aspatic; chất chuyển hóa của axit amin chẳng hạn như kynurenin, axit anthranilic, 3-hydroxykynurenin, và axit kynurenic, chất chuyển hóa của axit arachidonic chẳng hạn như prostaglandin E2; chất chuyển hóa sơ cấp của con đường đường phân hoặc chu trình Krebs chẳng hạn như axit lactic, axit suxinic, và axit xitric; và chất chuyển hóa nicotinamit chẳng hạn như 1-metyl nicotinamit) có thể được sử dụng.

Theo một phương án, trong phương pháp theo sáng chế, bước cho kháng nguyên tiếp xúc với thư viện thể thực khuẩn của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên, bước phân lập miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên, thử nghiệm của miền liên kết kháng nguyên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được phân lập khi có mặt hoặc không có hợp chất phân tử nhỏ có thể được thực hiện theo phương pháp được mô tả ở trên và phương pháp được mô tả dưới đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, đề cập đến các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật được đề cập của sáng chế.

Theo một phương án, đối với phương pháp theo sáng chế, phương pháp được mô tả trong Ví dụ 10 có thể được sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Theo mô tả chung ở trên, có thể hiểu rằng nhiều phương án khác nhau có thể được thực hiện.

Ví dụ 1: Điều chế kháng nguyên

(1-1) Điều chế vùng ngoại bào CD137 của người

Miền ngoại bào CD137 của người (còn được gọi là hCD137) được điều chế bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của CD137 của người, đoạn gen mã hóa đuôi histidin và đoạn gen mã hóa trình tự đặc hiệu mà biotin được bổ sung vào đó (trình tự AviTag, SEQ ID NO: 86) được liên kết. Đoạn gen mã hóa protein trong đó vùng ngoại bào của CD137 của người, đuôi histidin và AviTag được liên kết (CD137 của người hoặc hCD137-HisBAP, SEQ ID NO: 87), được hợp nhất vào vector biểu hiện tế bào động vật. Vector plasmit đã hình thành được chuyển nạp vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng 293fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, vector plasmit chứa gen biểu hiện EBNA1 (SEQ ID NO: 88) được chuyển nạp cùng lúc. Các tế bào được chuyển nạp các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂; và protein quan tâm (vùng ngoại bào CD137 của người) được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tế bào này được lọc qua màng lọc 0,22 µm để thu được chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy này được gắn vào HisTrap-HP (GE Healthcare) và vùng ngoại bào CD137 của người được liên kết với cột.

Vùng ngoại bào CD137 của người được tách rửa bằng dung dịch 20 mM natri phosphat, 500 mM natri clorua, và 500 mM imidazol, pH 7,5. Các chất kết tụ sau đó được loại bỏ bằng sắc ký lọc gel sử dụng Superdex 200 26/600 (GE healthcare) để tạo ra vùng ngoại bào CD137 của người được tinh chế. Nồng độ CD137 của người được tính toán bằng phương pháp của Pace *et al.* dựa trên trình tự axit amin ngoại trừ trình tự tín hiệu được gợi ý từ SEQ ID NO: 87 (SEQ ID NO: 183) (Pace, C.N., et al. Protein Science 1995; 4; 2411-2423).

(1-2) Điều chế miền ngoại bào CD137 của người (hCD137(FXa được tiêu hóa))

Miền ngoại bào CD137 của người (còn được gọi là hCD137(FXa được tiêu hóa)) được điều chế bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa trình tự có thể phân cắt được Factor Xa và đoạn gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể được nối với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của CD137 của người. Đoạn gen mã hóa protein trong đó vùng ngoại bào của CD137 của người, trình tự có thể phân cắt được Factor Xa và vùng hằng định kháng thể được liên kết (hCD137-F-Fc, SEQ ID NO: 89) được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật. Vector plasmit đã hình thành được chuyển nạp vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng 293fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, vector plasmit chứa gen mã hóa EBNA1 (SEQ ID NO: 88) được chuyển nạp cùng lúc. Các tế bào được chuyển nạp các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂; và hCD137-F-Fc được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tế bào được lọc qua màng lọc 0,22 µm, và chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập.

Các chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng cho cột chứa Protein A (MabSelect SuRe, GE Healthcare). hCD137-F-Fc được liên kết với cột và được rửa giải bằng dung dịch axit axetic 50nM. Sau khi dịch rửa giải được trung hòa bằng 1 M Tris-HCl, pH 8,0, dung môi hCD137-F-Fc được thay thế bằng 20 mM Tris, 100 mM natri clorua, 2 mM canxi clorua, pH 8,0. Tiếp theo, Factor Xa Proteaza (NEW ENGLAND BioLabs, Cat#. P8010L) được bổ sung và hCD137-F-Fc được tiêu hóa. Chất ức chế proteaza (DNS-GGACK, Calbiochem, Cat#251700) sau đó được bổ sung vào khi dừng phản ứng. 5 M natri clorua được bổ sung vào dung dịch phản ứng proteaza, và tổng thể tích của dung dịch điều chế được sử dụng cho HiTrap Benzamidin (GE Healthcare, Cat# 17-5143-01). Dung dịch được lọc qua cột còn được sử dụng cho cột Protein A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), và các đoạn đi qua được thu thập. Các đoạn đi qua được loại bỏ khỏi các chất kết tụ bằng sắc ký lọc gel sử dụng Superdex 200 Increase, 10/30 (GE Healthcare, Cat# 28990944), tạo ra vùng ngoại bào CD137 của người được tinh chế.

(1-3) Điều chế CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa

CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa (còn được đề cập đến là "hCD137-Fc được biotin hóa" hoặc "bio-hCD137-Fc", hoặc hCD137-Fc-Bio) được

điều chế bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể và đoạn gen mã hóa trình tự đặc hiệu nơi mà biotin được bổ sung vào đó (trình tự AviTag, SEQ ID NO: 86) được nối với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của CD137 của người. Đoạn gen mã hóa protein (CD137 của người dung hợp Fc, SEQ ID NO: 90) trong đó vùng ngoại bào CD137 của người, vùng hằng định kháng thể, và Avitag đã được liên kết được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật. Vector plasmit đã hình thành được chuyển nạp vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng 293-fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, gen biểu hiện EBNA1 (SEQ ID NO: 88) và gen biểu hiện biotin ligaza (BirA, SEQ ID NO: 91) được chuyển nạp đồng thời, và biotin được bổ sung cho mục đích biotin hóa CD137 của người dung hợp Fc. Các tế bào được chuyển nạp các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂; và protein quan tâm (CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa) được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tế bào này được lọc qua màng lọc 0,22 µm để thu được chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng cho cột chứa Protein A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), và CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa được liên kết với cột. CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa được tách rửa bằng dung dịch axit axetic 50nM. Các chất kết tụ sau đó được loại bỏ bằng sắc ký lọc gel với Superdex 200, 26/600 (GE Healthcare), và thu được CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa được tinh chế.

(1-4) Điều chế CD137 của người dung hợp Fc

CD137 của người dung hợp Fc (còn được đề cập đến là hCD137-Fc) được điều chế bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể và đoạn gen mã hóa trình tự đặc hiệu nơi mà biotin được bổ sung vào đó (trình tự AviTag, SEQ ID NO: 86) được nối với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của CD137 của người. Đoạn gen mã hóa protein (CD137 của người dung hợp Fc, SEQ ID NO: 90) trong đó vùng ngoại bào của CD137 của người, vùng hằng định kháng thể, và Avitag đã được liên kết được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật. Vector plasmit đã hình thành được chuyển nạp vào các tế bào FreeStyle293F (Invitrogen)

bằng cách sử dụng 293-fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, gen biểu hiện EBNA1 (SEQ ID NO: 88) được chuyển nạp đồng thời. Các tế bào được chuyển nạp các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂, và protein quan tâm (CD137 của người dung hợp Fc) được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tế bào này được lọc qua màng lọc 0,22 µm để thu được chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng cho cột chứa Protein A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), và CD137 của người dung hợp Fc được liên kết với cột. CD137 của người dung hợp Fc được tách rửa bằng dung dịch axit axetic 50nM. Tiếp theo, các chất kết tụ được loại bỏ bằng sắc ký lọc gel với Superdex 200, 26/600 (GE Healthcare), và thu được CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa được tinh chế.

(1-5) Điều chế CD137 của khỉ dung hợp Fc được biotin hóa

CD137 của khỉ dung hợp Fc được biotin hóa (còn được đề cập đến là “cyCD137-Fc-BAP”) được điều chế bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa vùng hằng định của kháng thể và đoạn gen mã hóa trình tự đặc hiệu nơi mà biotin được bổ sung vào đó (trình tự AviTag, SEQ ID NO: 86) được nối với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa vùng ngoại bào của CD137 của khỉ. Đoạn gen mã hóa protein trong đó vùng ngoại vào CD137 của khỉ, vùng hằng định kháng thể, và Avitag được liên kết (CD137 của khỉ dung hợp Fc, SEQ ID NO: 92) được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật.

Vector plasmit đã hình thành được chuyển nạp vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng 293-fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, gen biểu hiện EBNA1 (SEQ ID NO: 88) và gen biểu hiện biotin ligaza (BirA, SEQ ID NO: 91) được chuyển nạp đồng thời; và biotin được bổ sung cho mục đích gắn nhãn CD137 của khỉ dung hợp Fc bằng biotin. Các tế bào được chuyển nạp các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂; và protein quan tâm (CD137 của khỉ dung hợp Fc được biotin hóa) được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy tế bào này được lọc qua màng lọc 0,22 µm để thu được chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng cho cột chứa Protein A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), và CD137 của khỉ dung hợp Fc được biotin hóa được liên kết với cột. CD137 của khỉ dung hợp Fc được biotin hóa được tách rửa bằng dung dịch axit axetic 50nM. Các chất kết tụ sau đó được loại bỏ bằng sắc ký lọc gel sử dụng Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare), và thu được CD137 của khỉ dung hợp Fc được biotin hóa được tinh chế.

Ví dụ 2: Thu được kháng thể CD137 phụ thuộc ATP

(2-1) Việc thu các kháng thể với hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc phân tử nhỏ (các kháng thể chuyển phân tử nhỏ) từ thư viện được thiết kế một cách hợp lý sử dụng ATP (1)

(2-1-1) Phân tích trọng lượng

Các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết đối với kháng nguyên khi có mặt adenosin triphosphat (adenosin 5'-triphosphat; ATP) được thu từ thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể được thiết kế một cách hợp lý được tạo thành trong patent trước, WO2015/083764. Lưu ý rằng các kháng thể với hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc phân tử nhỏ (ví dụ, CD137) có thể được đề cập đến là “các kháng thể chuyển” hoặc “các kháng thể chuyển phân tử nhỏ”, và các kháng thể với hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP (ví dụ, CD137) có thể được đề cập đến là “các kháng thể chuyển” hoặc “các kháng thể chuyển ATP”. Đối với quá trình thu thập, các thể thực khuẩn trình diện kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết khi có mặt ATP đối với kháng nguyên được bắt giữ trên các hạt được thu thập. Sau đó, các thể thực khuẩn được thu thập từ dịch rửa giải được rửa giải khỏi các hạt khi không có ATP.

Các thể thực khuẩn được tạo ra bằng phương pháp chung từ *E. coli* mang phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành. Cụ thể là, *E. coli* mang vector phagemid đã tạo thành được gây nhiễm M13KO7ΔpIII (được ký hiệu là “hyperphage”) (PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn được thu thập từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Dung dịch thư viện thể thực khuẩn thu được bằng cách pha loãng với dung dịch đệm Tris (TBS), quần thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện. BSA sau đó được bổ

sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện bằng cách sử dụng kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm. Đối với các hạt nam châm, các hạt Sera-Mag NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific) hoặc Dynabeads M-280 StreptAvidin (Life Technologies) được sử dụng. Đối với kháng nguyên, adenosin triphosphat được biotin hóa (adenosin 5'-triphosphat; ATP) được mua từ Jena Bioscience, hoặc hCD137-Fc-Bio (SEQ ID NO: 90) hoặc bio-hCD137 (SEQ ID NO: 89) đã được biotin hóa từ hCD137(FXa được tiêu hóa) sử dụng NHS-PEO4-Biotin được đo trước không trọng lượng (PIERCE) được tạo ra ở các ví dụ 1-2 và 1-3 được sử dụng.

Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện để thu được phân tử nhỏ một cách hiệu quả mà có thể đóng vai trò chuyển đổi ở các kháng thể chuyển phụ thuộc vào các mô ung thư. Cụ thể là, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt ATP là phân tử nhỏ, và không liên kết với kháng nguyên khi không có ATP được thực hiện dựa vào phương pháp được thể hiện trong patent WO2015/083764 trước đó. Ở vòng 1, đối với tất cả hCD137 được biotin hóa (bio-hCD137), hCD137-Fc-Bio và ATP được biotin hóa (bio-ATP), quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp trong đó việc giữ cố định pha rắn của các kháng nguyên được biotin hóa trên các hạt nam châm (được gọi là “phương pháp pha rắn hạt”) trước khi bổ sung dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị. Đối với Bio-ATP, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể mà có thể liên kết với kháng nguyên (Bio-ATP) khi không có ATP dưới dạng hợp chất phân tử nhỏ được thực hiện dựa vào phương pháp được mô tả trong patent WO2015/083764 trước đó. Đối với hCD137-Fc-Bio, 4 nmol vùng Fc IgG1 không được biotin hóa của người được bổ sung để loại bỏ các kháng thể liên kết với vùng Fc. Các thể thực khuẩn thu được được bổ sung vào chủng *E. coli* ER2738 để gây nhiễm thể thực khuẩn với *E. coli*, sau đó *E. coli* thu được được gây nhiễm hyperphage, và thể thực khuẩn được thu thập từ chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C.

Từ vòng 2 trở đi, quá trình phân tích trọng lượng chỉ được thực hiện trên hCD137 được biotin hóa (bio-hCD137) và hCD137-Fc-Bio để làm giàu các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt ATP và không liên kết với kháng nguyên khi không có ATP theo phương pháp pha rắn hạt, bằng cách tham chiếu tới phương pháp được thể hiện trong patent WO2015/083764 trước đó. Đối với hCD137-Fc-

Bio ở cả hai trường hợp, 4 nmol vùng Fc IgG1 không được biotin hóa của người được bổ sung để loại bỏ các kháng thể liên kết với vùng Fc. Quá trình phân tích trọng lượng tương tự được lặp lại tới vòng 5 để làm giàu trình tự kháng thể quan tâm.

(2-1-2) Đánh giá hoạt tính liên kết khi có và không có mặt ATP bằng ELISA thể thực khuẩn

Từ các khuẩn lạc đơn lẻ của *E. coli* thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy chứa thể thực khuẩn được thu thập bằng phương pháp thông thường (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) được sử dụng để siêu lọc chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được. Dòng chảy qua được loại bỏ bằng cách ly tâm (4500 g, 45 phút) NucleoFast 96 mà 100 μ L chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy đã được sử dụng trong mỗi giếng. NucleoFast 96 được rửa lại bằng cách ly tâm (4500 g trong 30 phút) bằng cách bổ sung 100 μ L H₂O vào mỗi giếng. Cuối cùng, 100 μ L TBS được bổ sung, và dung dịch thể thực khuẩn có trong các chất nổi bề mặt trong các giếng NucleoFast 96, được để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, được thu hồi.

Các thể thực khuẩn được tinh chế bằng TBS hoặc ATP/TBS được đưa vào ELISA theo quy trình sau. Các đĩa vi thể được phủ Streptavidin 384 giếng (Greiner) được phủ qua đêm bằng 10 μ L TBS chứa các kháng nguyên được biotin hóa (bio-hCD137, hCD137-Fc-Bio, và bio-Fc) được tạo ra trong Ví dụ 1. Sau khi các kháng nguyên được biotin hóa mà không liên kết với đĩa được loại bỏ bằng cách rửa mỗi giếng của đĩa bằng dung dịch muối đệm Tris với Tween 20 (TBST), các giếng được phong bế bằng 80 μ L 2% sữa tách béo-TBS trong 1 giờ hoặc lâu hơn. 2% sữa tách béo-TBS được loại bỏ bằng cách rửa TBST, sau đó các thể thực khuẩn trình diện kháng thể được cho phép liên kết với kháng nguyên được biotin hóa có trong mỗi giếng khi không có và có mặt ATP, bằng cách để yên các đĩa với các thể thực khuẩn tinh chế đã chuẩn bị được bổ sung vào mỗi giếng trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Các kháng thể kháng M13 tiếp hợp với HRP (GE Healthcare 27-9421-01) được pha loãng bằng TBS hoặc ATP/TBS được bổ sung vào mỗi giếng được rửa bằng TBST hoặc ATP/TBST, và đĩa được ủ trong một giờ. Sau khi rửa bằng TBST hoặc ATP/TBST, quá trình hiện màu của dung dịch trong mỗi giếng mà dung dịch đơn

TMB (ZYMED) được bổ sung vào được dừng bằng cách bổ sung axit sulfuric, và sau đó quá trình hiện màu được đo bằng độ hấp thụ ở 450 nm.

Kết quả là, một số kháng thể có hoạt tính liên kết với bio-hCD137 hoặc hCD137-Fc-Bio bị thay đổi khi có và không có mặt ATP được xác định.

Các kết quả ELISA thể thực khuẩn sử dụng các dòng vô tính sau khi phân tích trọng lượng vòng 4 và 5 được thể hiện trong Bảng 9.

Ở đây, các dòng vô tính có độ hấp thụ 0,2 hoặc lớn hơn khi có mặt ATP và tỷ lệ hấp thụ S/N cao hơn 2 khi có mặt/không có mặt kháng nguyên được xác định là các dòng vô tính dương. Ngoài ra, trong số các dòng vô tính dương, các dòng vô tính có độ hấp thụ S/N lớn hơn 2 khi có mặt/không có mặt ATP được đánh giá là các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP (các dòng vô tính chuyển).

Bảng 9

Kháng nguyên được sử dụng trong quá trình phân tích trọng lượng	hCD137 được biotin hóa		hCD137-Fc-Bio	
	4	5	4	5
Vòng	4	5	4	5
Số lượng dòng vô tính đưa vào ELISA	384	384	384	384
Số lượng dòng vô tính dương (độ hấp thụ ở ATP+ $\geq 0,2$; Tỷ lệ kháng nguyên +/- $> 2,0$)	31	4	125	169
Số lượng dòng vô tính chuyển (tỷ lệ ATP+/- > 2)	12	2	118	164

(2-1-3) Phân tích trình tự của các kháng thể chuyển có hoạt tính liên kết kháng nguyên được biến đổi bởi sự có mặt/không có mặt của ATP

Các trình tự nucleotit của gen được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu pBAD-F, G1seq-R từ các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP (các dòng vô tính chuyển) dựa trên các kết quả ELISA thể thực khuẩn được phân tích. Kết quả của quá trình phân tích là thu được các trình tự nucleotit của các dòng vô tính được đánh giá là liên kết với CD137 của người khi có mặt ATP và không liên kết với CD137 của người khi không có ATP.

(2-2) Thu các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt phân tử nhỏ từ thư viện được thiết kế một cách hợp lý sử dụng ATP (2)

(2-2-1) Phân tích trọng lượng

Các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết với kháng nguyên khi có mặt ATP được thu từ thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể được thiết kế một cách hợp lý được tạo thành ở patent WO2015/083764 trước đó. Đối với việc thu thập, các thể thực khuẩn trình diện kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết với kháng nguyên khi có mặt ATP được thu hồi, sau đó là sự thu hồi thể thực khuẩn từ dịch rửa giải được rửa giải khỏi các hạt khi không có ATP.

Các thể thực khuẩn được tạo ra bằng phương pháp chung từ *E. coli* mang phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành. Cụ thể là, *E. coli* mang vector phagemid đã tạo thành được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015046554A1) hoặc M13KO7ΔpIII (hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Dung dịch thư viện thể thực khuẩn thu được bằng cách pha loãng bằng TBS quản thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện. BSA sau đó được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện bằng cách sử dụng kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm. Các hạt được phủ NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated), các hạt NeutrAvidin (TAMAGAWA SEIKI) hoặc Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng làm các hạt nam châm. Đối với kháng nguyên, hCD137-Fc-Bio hoặc bio-hCD137 được tạo ra trong Ví dụ 1 được sử dụng.

Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện để thu được các kháng thể chuyển phân tử nhỏ một cách hiệu quả phụ thuộc vào phân tử nhỏ mà có thể đóng vai trò chuyển ở các mô ung thư. Cụ thể là, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt adenosin triphosphat (adenosin 5'-triphosphat; ATP) là phân tử nhỏ, và không liên kết với kháng nguyên khi không có ATP được thực hiện dựa vào phương pháp được mô tả trong patent WO2015/083764 trước đó. Đối với bio-hCD137, phương pháp bổ sung trước dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị sau khi giữ cố định pha rắn của các kháng

nguyên được biotin hóa trên các hạt nam châm (được đề cập đến là “phương pháp pha rắn hạt”) và phương pháp bổ sung trước các hạt nam châm sau khi trộn dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị với các kháng nguyên được biotin hóa (được đề cập đến là “phương pháp pha lỏng”) được thực hiện. Đối với hCD137-Fc-Bio, 4 nmol vùng Fc IgG1 không được biotin hóa của người được bổ sung để loại bỏ các kháng thể liên kết với vùng Fc, và quá trình phân tích trọng lượng chỉ được thực hiện theo phương pháp pha lỏng. Các thể thực khuẩn thu được được bổ sung vào chủng *E. coli* ER2738 và cho phép lây nhiễm *E. coli*, sau đó *E. coli* thu được được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015046554A1) hoặc M13KO7ΔpIII (hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và sau khi nuôi cấy qua đêm ở 30°C, các thể thực khuẩn được thu thập từ chất nổi bề mặt. Quá trình phân tích trọng lượng tương tự được lặp lại đến vòng 5.

(2-2-2) Đánh giá hoạt tính liên kết khi có và không có mặt ATP bằng ELISA thể thực khuẩn

Từ các khuẩn lạc đơn lẻ của *E. coli* thu được sau mỗi vòng bằng các phương pháp được mô tả ở trên, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy chứa thể thực khuẩn được thu thập bằng phương pháp thông thường (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) được sử dụng để siêu lọc chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được. Dòng chảy qua được loại bỏ bằng cách ly tâm (4500 g, 45 phút) NucleoFast 96 mà 100 µL chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng trong mỗi giếng. NucleoFast 96, trong đó 100 µL H₂O được bổ sung vào mỗi giếng, được rửa lại bằng cách ly tâm (4500 g trong 30 phút). Cuối cùng, 100 µL TBS được bổ sung, và dung dịch thể thực khuẩn có trong các chất nổi bề mặt trong các giếng NucleoFast 96, được để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, được thu hồi.

Các thể thực khuẩn được tinh chế bằng TBS hoặc ATP/TBS bổ sung được đưa vào ELISA theo quy trình dưới đây. Các đĩa microtiter StreptaWell 96 (Roche) được giữ cố định qua đêm bằng 100 µL TBS chứa các kháng nguyên được biotin hóa (hCD137-Fc-Bio hoặc bio-hCD137) được tạo ra trong Ví dụ 1. Sau khi loại bỏ kháng nguyên được biotin hóa mà không liên kết với các đĩa bằng cách rửa mỗi giếng của đĩa bằng TBST, các đĩa được phong bế bằng 250 µL 2% SkimMilk-TBS trong 1 giờ hoặc lâu hơn. 2% SkimMilk-TBS được loại bỏ, và sau đó các thể thực

khuẩn trình diện kháng thể được liên kết với kháng nguyên được biotin hóa có trong mỗi giếng khi không có và có mặt ATP bằng cách để các đĩa với các thể thực khuẩn tinh chế đã chuẩn bị được bổ sung vào mỗi giếng ở 37°C trong một giờ. Các kháng thể kháng M13 tiếp hợp với HRP (GE Healthcare 27-9421-01) được pha loãng bằng TBS hoặc ATP/TBS được bổ sung vào mỗi giếng được rửa bằng TBST hoặc ATP/TBST, và đĩa được ủ trong một giờ. Sau khi rửa TBST hoặc ATP/TBST, quá trình hiện màu của dung dịch trong mỗi giếng mà dung dịch TMB đơn (ZYMED) được bổ sung vào được dừng bằng cách bổ sung axit sulfuric, và sau đó quá trình hiện màu được đo bằng độ hấp thụ ở 450 nm.

Kết quả là, một số kháng thể có hoạt tính liên kết với bio-hCD137 hoặc hCD137-Fc-Bio bị thay đổi khi có và không có mặt ATP được xác định.

Như một ví dụ, các kết quả ELISA thể thực khuẩn sử dụng các dòng vô tính sau khi phân tích trọng lượng vòng 5 được thể hiện trong Bảng 10.

Ở đây, các dòng vô tính có độ hấp thụ 0,2 hoặc lớn hơn khi có mặt ATP và tỷ lệ hấp thụ S/N cao hơn 2 khi có mặt/không có mặt kháng nguyên được xác định là các dòng vô tính dương. Ngoài ra, trong số các dòng vô tính dương, các dòng vô tính có tỷ lệ hấp thụ S/N cao hơn 2 khi có mặt/không có mặt ATP được xác định là các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP (các dòng vô tính chuyển).

Bảng 10

Kháng nguyên được sử dụng trong quá trình phân tích trọng lượng	hCD137-Fc-Bio	hCD137-Fc-Bio	hCD137 được biotin hóa	hCD137 được biotin hóa
Phương pháp phân tích trọng lượng	Pha lỏng	Pha lỏng	Pha lỏng	Pha rắn hạt
Thể thực khuẩn phụ được sử dụng trong quá trình phân tích trọng lượng	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII và M13KO7TC	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII

Số lượng dòng vô tính đưa vào ELISA	384	96	96	96
Số lượng dòng vô tính dương (độ hấp thụ ở ATP+ $\geq 0,2$; tỷ lệ kháng nguyên +/- > 2)	383	79	41	29
Số lượng dòng vô tính chuyển (tỷ lệ ATP +/- > 2)	375	77	40	29

(2-2-3) Phân tích trình tự của các kháng thể chuyển có hoạt tính liên kết kháng nguyên được biến đổi bởi sự có mặt/không có mặt của ATP

Các trình tự nucleotit của gen được khuếch đại từ các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP (các dòng vô tính chuyển) dựa trên các kết quả ELISA thể thực khuẩn được phân tích bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu pBAD-F, G1seq-R. Kết quả của quá trình phân tích là thu được các trình tự nucleotit của các dòng vô tính được đánh giá là liên kết với CD137 của người khi có mặt ATP và không liên kết với CD137 của người khi không có ATP.

(2-3) Lựa chọn các kháng thể chuyển

Mười bảy mẫu được chọn từ các dòng vô tính được đánh giá là có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP thu được là kết quả của quá trình phân tích trong các ví dụ 2-1-3 và 2-2-3, và tên các dòng vô tính được gán lại được mô tả trong Bảng 11.

Bảng 11

	Tên thể thực khuẩn	Tên dòng vô tính của vùng biến đổi kháng thể
1	dBBATk14-4_003	dBBAT007
2	dBBATk14-4_089	dBBAT013

3	dBBATk17-4_002	dBBAT015
4	dBBATk17-4_009	dBBAT017
5	dBBATk17-4_075	dBBAT019
6	dBBATk05-5_052	dBBAT021
7	dBBATk05-5_076	dBBAT025
8	dBBATk12-5_038	dBBAT029
9	dBBATk12-5_048	dBBAT031
10	dBBATk14-5_012	dBBAT037
11	dBBATk14-5_053	dBBAT042
12	dBBAHk14SF-3_016	dBBAT053
13	dBBAHk14SF-3_032	dBBAT056
14	dBBAHk14FF-4_028	dBBAT091
15	dBBAHk14FS-5_074	dBBAT112
16	dBBAHk14MS-5_034	dBBAT118
17	dBBAHk14MS-5_093	dBBAT119

(2-4) Sự biểu hiện và tinh chế các kháng thể chuyển có hoạt tính liên kết kháng nguyên được biến đổi bởi sự có mặt/không có mặt của ATP

Các gen mã hóa các vùng biến đổi của các kháng thể được mô tả trong Bảng 11, được thu từ thư viện thể thực khuẩn được thiết kế một cách hợp lý, được cài xen vào các plasmit IgG1/Lambda của người để biểu hiện ở động vật. Các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng phương pháp dưới đây. Các plasmit được tạo ra được đưa vào bằng phương pháp lipofection vào dòng có nguồn gốc từ tế bào bào thai thận của người FreeStyle 293-F (Invitrogen), được tạo huyền phù trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen) ở mật độ tế bào là $1,33 \times 10^6$ tế bào/mL, trong đó 3 mL được cấy vào mỗi giếng của đĩa 6 giếng. Các kháng thể được tinh chế bằng cách sử dụng rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) từ chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được nuôi cấy trong bốn ngày trong thiết bị ủ CO₂ (37°C, 8% CO₂, 90 vòng/phút) theo phương pháp đã biết đối với người có

hiệu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quang phổ kế được sử dụng để đo độ hấp thụ ở 280 nm của các dung dịch kháng thể được tinh chế. Từ các giá trị đo thu được, các nồng độ của các kháng thể đã tinh chế được tính toán bằng cách sử dụng hệ số tắt được tính toán bằng phương pháp PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(2-5) Đánh giá các kháng thể kháng CD137 được xác định bởi phương pháp hiển thị thể thực khuẩn

(2-5-1) Sự biểu hiện và tinh chế các kháng thể chuyển liên kết với kháng nguyên phụ thuộc vào sự có mặt hay không có mặt của ATP và các chất chuyển hóa của nó

Các gen mã hóa các vùng biến đổi của các kháng thể thu được từ thư viện thể thực khuẩn được thiết kế một cách hợp lý của người được cài xen vào các plasmit biểu hiện của động vật có miễn hằng định chuỗi nặng dung hợp với gen mã hóa vùng cùng hướng Gly và Lys của IgG1 của người được cải biến (P253) (SEQ ID NO: 93) và vùng hằng định chuỗi nhẹ, chuỗi Lambda Lamlib (SEQ ID NO: 63). Tên dòng vô tính và số lượng trình tự được liệt kê trong Bảng 12.

Các dòng vô tính được đánh giá

Bảng 12

	Tên dòng vô tính	SEQ ID NO của chuỗi nặng (độ dài đầy đủ)	SEQ ID NO của chuỗi nhẹ (độ dài đầy đủ)
1	dBAT007-P253	94	113
2	dBAT013-P253	95	114
3	dBAT015-P253	96	115
4	dBAT017-P253	97	116
5	dBAT019-P253	98	117
6	dBAT025-P253	99	118
7	dBAT029-P253	100	119
8	dBAT031-P253	100	119
9	dBAT037-P253	101	120
10	dBAT042-P253	102	121

11	dBBAT053-P253	103	122
12	dBBAT056-P253	104	123
13	dBBAT021-P253	105	124
14	dBBAT091-P253	106	125
15	dBBAT112-P253	107	126
16	dBBAT118-P253	108	127
17	dBBAT119-P253	109	128
18	dBBAT121-P253	110	129
19	dBBAT122-P253	111	130
20	dBBAT134-P253	112	131

Các kháng thể được biểu hiện và được tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quang phổ kế được sử dụng để đo độ hấp thụ ở 280 nm của các dung dịch kháng thể được tinh chế. Từ các giá trị đo thu được, các nồng độ của các kháng thể đã tinh chế được tính toán bằng cách sử dụng hệ số tắt được tính toán bằng phương pháp PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(2-5-2) Đánh giá tác dụng của ATP, ADP, và AMP đối với liên kết CD137 của người bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Biacore T200 (GE Healthcare) được sử dụng để phân tích tương tác của phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa các kháng thể kháng CD137 và hCD137 (FXa digest). Các kháng thể kháng CD137 được bắt giữ trên chip cảm biến CM3 (GE Healthcare) mà Protein G (CALBIOCHEM) được giữ cố định với lượng thích hợp bằng phương pháp ghép cặp amin, và hCD137 (FXa digest) được điều chế trong Ví dụ 1-2 được cho phép intrương tác. Đối với hệ đệm chạy, 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% Tween20 (pH 7,4) được sử dụng, và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5) được sử dụng làm dung dịch tái sinh.

Sau khi bắt giữ các kháng thể kháng CD137 được tạo huyền phù trong TBS, 500 nM hCD137 (FXa digest) được tiêm vào mỗi tế bào dòng với tốc độ dòng là 10

μL /phút trong ba phút. Khoảng thời gian ba phút này đóng vai trò là pha liên kết đối với hCD137 (FXa digest), và sau khi pha liên kết kết thúc, khoảng thời gian hai phút để chuyển sang hệ đệm chạy đóng vai trò là pha phân ly đối với hCD137 (FXa digest). Sau khi hoàn thành pha phân ly, dung dịch tái sinh được tiêm với tốc độ dòng là $30 \mu\text{L}$ /phút trong 30 giây. Trên đây là chu trình để đo hoạt tính liên kết của các kháng thể kháng CD137. Lượng liên kết của hCD137 (FXa digest) mà tương tác với kháng thể kháng CD137 trong pha liên kết được điều chỉnh bởi lượng kháng thể bị bắt giữ. Phần mềm đánh giá Biacore T200 phiên bản 2.0 được sử dụng để thể hiện lượng liên kết (RU) trên mỗi phối tử bắt giữ 1RU, và tthu được các giá trị của lượng bắt giữ kháng thể (lượng kháng thể bị bắt giữ) và lượng liên kết kháng nguyên. Lượng liên kết kháng nguyên được thể hiện trong Bảng 13. Do lượng liên kết kháng nguyên phản ánh hoạt tính liên kết, nên nó có thể được cho là phụ thuộc vào phân tử nhỏ được nhận biết khi giá trị có mặt phân tử nhỏ (ATP, ADP hoặc AMP) cao hơn giá trị không có phân tử nhỏ. Cụ thể là, sự khác biệt càng lớn thì sự phụ thuộc vào phân tử nhỏ càng cao.

Bảng 13

Tên dòng vô tính	Loại phân tử nhỏ, điều kiện nồng độ							Không có phân tử nhỏ
	1mM ATP	100 μ M ATP	100 μ M ADP	10 μ M ADP	1mM AMP	100 μ M AMP		
dBAT007-P253	49,2	29,5	89,0	70,0	28,5	16,5	3,6	
dBAT013-P253	26,2	8,1	77,3	48,5	13,8	6,6	2,7	
dBAT015-P253	8,3	3,1	41,8	17,9	11,9	5,5	1,5	
dBAT017-P253	9,8	5,0	39,7	18,8	6,8	4,8	4,4	
dBAT019-P253	3,8	3,0	25,7	7,4	11,1	4,6	3,7	
dBAT021-P253	9,2	2,4	56,6	19,6	5,7	3,0	2,9	
dBAT025-P253	28,5	10,0	89,1	55,7	16,4	6,1	4,4	
dBAT029-P253	10,9	6,9	53,3	38,5	17,4	11,4	3,7	
dBAT031-P253	8,4	5,0	47,8	33,3	14,8	8,3	2,8	
dBAT037-P253	27,5	15,9	72,1	62,9	21,7	13,8	3,8	
dBAT042-P253	11,7	4,3	58,7	19,1	7,8	4,7	2,9	
dBAT053-P253	15,0	8,4	46,9	40,4	9,6	6,9	1,9	
dBAT056-P253	20,3	13,4	59,4	50,7	12,8	9,7	3,7	
dBAT118-P253	27,7	14,1	76,9	62,9	14,9	8,7	3,3	
dBAT121-P253	11,5	4,8	42,3	24,7	6,1	2,6	1,9	
dBAT122-P253	11,5	4,7	55,5	19,2	5,7	4,1	3,3	
dBAT134-P253	5,2	4,4	29,3	16,2	3,7	4,5	3,0	
dBAT091-P253	6,2	3,0	33,0	20,0	2,9	3,3	1,5	
dBAT112-P253	12,6	6,3	43,0	27,4	6,5	4,8	3,7	
dBAT119-P253	45,7	12,9	112,5	67,2	58,6	26,9	3,3	

(2-5-3) Đánh giá hoạt tính liên kết với kháng nguyên CD137 của khí

Các kháng thể thu được được đánh giá liên kết với CD137 của khi bằng ELISA. cyCD137-Fc-BAP được điều chế trong Ví dụ 1 được giữ cố định trên các đĩa microtiter Streptawell. Sau khi kháng nguyên không liên kết được loại bỏ khỏi các đĩa bằng cách rửa mỗi giếng của đĩa bằng hệ đệm rửa, các giếng được phong bế bằng 150 μ L hệ đệm phong bế (TBS với 2% BSA) trong 1 giờ hoặc lâu hơn. Hệ đệm phong bế được loại bỏ khỏi mỗi giếng, và 100 μ L các kháng thể tinh chế được pha loãng trong TBS với nồng độ cuối cùng là 1 mM ADP, hoặc TBS với nồng độ cuối cùng là 1 mM ADP được bổ sung vào mỗi giếng. Đĩa mà kháng thể được bổ sung vào được lắc 600 vòng/phút trong một giờ. Các kháng thể kháng lambda của người tiếp hợp với AP (BETHYL) được pha loãng trong TBS với nồng độ cuối cùng là 1 mM ADP được bổ sung vào mỗi giếng sau khi rửa bằng hệ đệm rửa (TBS với 0,1% Tween20) có nồng độ cuối cùng là 1 mM ADP. Sau khi ủ trong một giờ và rửa bằng hệ đệm rửa chứa nồng độ cuối cùng là 1 mM ATP, chất nền BluePhos phosphat (KPL) được bổ sung. Quá trình hiện màu được đo bằng độ hấp thụ ở 600 nm. Tốc độ tăng trong độ hấp thụ ở nồng độ kháng thể là 0 μ g/mL được thể hiện trong Bảng 14. Các mẫu có sự gia tăng tỷ lệ hấp thụ phụ thuộc nồng độ có thể được coi là được liên kết với CD137 của khi.

Tốc độ hấp thụ

Bảng 14

CD137 khi		dBBAT007	dBBAT013	dBBAT015	dBBAT017	dBBAT019	dBBAT021	dBBAT025	dBBAT029	dBBAT037	dBBAT042
Nồng độ kháng thể [μ g/mL]	10	30,5	43,2	42,9	25,6	40,5	40,5	72,0	50,3	32,5	41,8
	2,5	30,2	42,4	32,4	8,7	40,3	14,0	67,6	42,7	12,7	40,0
	0,625	29,2	33,3	14,4	3,1	39,1	4,6	49,7	26,7	4,6	31,3
	0,156	22,0	15,3	3,6	1,4	23,7	1,7	20,7	9,7	1,9	12,2
	0,039	0,7	4,2	1,5	1,2	8,2	1,2	4,5	2,0	1,3	2,9
	0,010	3,8	1,5	1,1	1,2	2,5	0,9	1,6	1,1	1,1	1,3
	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		dBBAT053	dBBAT056	dBBAT091	dBBAT112	dBBAT118	dBBAT119	dBBAT121	dBBAT122	dBBAT134	
Nồng độ kháng thể [μ g/mL]	10	17,9	23,1	15,1	19,8	35,4	55,3	26,0	31,9	33,9	
	2,5	6,9	10,7	5,5	8,1	30,6	56,6	16,4	16,7	16,8	
	0,625	2,3	3,6	1,7	2,8	18,1	57,2	5,9	5,7	5,8	
	0,156	1,0	1,3	0,7	1,0	7,1	47,7	1,3	1,9	2,2	
	0,039	0,7	0,8	0,5	0,6	1,8	26,6	0,6	1,0	1,2	
	0,010	0,8	1,2	0,6	0,6	1,0	10,2	0,6	0,9	1,0	
	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

(2-5-4) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 bằng cách sử dụng các tế bào Jurkat.

Dòng tế bào GloResponse™ NF-kappa B-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega) được sử dụng để đo hoạt tính kháng thể *in vitro*. 10 μ L tế bào Fc γ RIIB CHO-K1 (Promega) được điều chế ở nồng độ 2×10^6 /mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 384 giếng. Sau đó, 10 μ L dung dịch kháng thể chứa ADP, dung dịch kháng thể chứa ATP, hoặc dung dịch kháng thể không chứa ATP hoặc ADP được bổ sung vào mỗi giếng. Sau đó, 10 μ L dòng tế bào GloResponse™ NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chế đến nồng độ 2×10^6 /mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Nồng độ cuối cùng của ADP là 50 μ M; và nồng độ cuối cùng của ATP là 50 μ M. Các đĩa được để yên trong sáu giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂ sau đó là 15 phút ở nhiệt độ phòng, và 30 μ L thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang của giếng không được bổ sung kháng thể là số lần phát quang và đóng vai trò làm chỉ số đánh giá hoạt tính của mỗi kháng thể.

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 1 và Fig. 2. Từ Fig. 1 và Fig. 2, được xác nhận rằng tất cả các kháng thể ngoại trừ NS1-P253, là kháng thể không chuyển, đều bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 của người theo cách phụ thuộc ATP và ADP.

(2-6) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 *in vitro* của các kháng thể chuyển thu được từ quá trình phân tích trọng lượng sử dụng các tế bào T của người

(2-6-1) Sự phát triển các môi trường nuôi cấy tế bào T của người

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người được phân lập từ các mẫu máu của các tình nguyện viên khỏe mạnh được sử dụng. 50 mL máu được trộn với 0,5 mL heparin và được pha loãng thêm bằng 50 mL PBS. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người được phân lập theo hai bước dưới đây. Ở bước thứ nhất, Leucosep (greiner bio-one) được bổ sung Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) được ly tâm ở 1000 x g trong một phút ở nhiệt độ phòng, sau đó là bổ sung máu được pha loãng bằng PBS, và ly tâm ở nhiệt độ phòng được thực hiện ở 400 x g trong 30 phút. Ở bước thứ hai, thu lại lớp màng đệm từ các ống sau quá trình ly tâm, sau đó rửa bằng 60 ml PBS

(Wako). Sau đó, sự hoạt hóa tế bào T/bộ kit mở rộng/(MACS Miltenyi biotec) của người được sử dụng để mở rộng môi trường nuôi cấy của các tế bào T.

(2-6-2) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 in vitro bằng cách sử dụng các tế bào T người

2×10^4 tế bào T có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người và 2×10^4 tế bào REC-1 được tạo huyền phù ở 100 μ L môi trường RPMI1640 chứa 30 U/mL IL-2 của người (SIGMA), 10 ng/mL PMA (SIGMA), 0,5 μ g/mL Ionomycin, 500 μ M ADPbetaS (Sigma), và 10% FBS (Sigma), và được cấy vào các đĩa đáy phẳng đa giếng 96 giếng (Corning) với kháng thể đối chứng IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0, NS1-P253 là kháng thể có hoạt tính liên kết với CD137 người không phụ thuộc ATP (được đề cập đến là "kháng thể không chuyển" hoặc "kháng thể CD137 không chuyển" trong suốt các ví dụ thực hiện sáng chế), hoặc các dòng vô tính bất kỳ được mô tả trong Bảng 12. NS1-P253, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 và các dòng vô tính được mô tả trong Bảng 12 được đánh giá ở 10 μ g/mL. Sự sản sinh IFN- γ trong môi trường ADPbetaS-minus cũng được đánh giá. Các đĩa được lắc và sau đó để yên ở 37°C trong 72 giờ trong thiết bị ủ 5% CO₂. Sau đó, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập và lượng IFN- γ có trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit phát triển IFN- γ ELISA ở người (PeproTech). ELISA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit (PeproTech). Các phép đo độ hấp thụ được thực hiện với EnVision (PerkinElmer).

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 3.

Được xác nhận rằng dBBAT007-P253, dBBAT013-P253, dBBAT015-P253, dBBAT019-P253, dBBAT021-P253, dBBAT025-P253, dBBAT031-P253, dBBAT042-P253, dBBAT056-P253, dBBAT118-P253, dBBAT121-P253, dBBAT122-P253, và dBBAT119-P253 bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 ở người theo cách phụ thuộc ADPbetaS. ADPbetaS là chất tương tự ADP mà ít nhạy với sự thủy phân hơn ADP. Điều này cho thấy khả năng các kháng thể chuyển CD137 của người này thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 của người theo cách phụ thuộc vào phân tử nhỏ như ATP, ADP hoặc AMP.

(2-6-3) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 in vitro bằng cách sử dụng các tế bào T người (2)

2×10^4 tế bào T có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người và 2×10^4 tế bào REC-1 được tạo huyền phù ở 100 μ L môi trường RPMI1640 chứa 30 U/mL IL-2 của người (SIGMA), 10 ng/mL PMA (SIGMA), 0,5 μ g/mL Ionomycin, 500 μ M ADPbetaS (Sigma), và 10% FBS (Sigma), và được cấy vào các đĩa đáy phẳng đa giếng 96 giếng (Corning), với NS1-P253 (kháng thể không chuyển) hoặc dBBAT119-P253. NS1-P253 và dBBAT119-P253 được đánh giá ở các nồng độ 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032, và 0,00064 μ g/mL. Các đĩa được lắc và sau đó để yên ở 37°C trong 72 giờ trong thiết bị ủ 5% CO₂. Sau đó, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập và lượng IFN- γ có trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit phát triển IFN- γ ELISA ở người (PeproTech). ELISA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit (PeproTech). Các phép đo độ hấp thụ được thực hiện bằng EnVision (PerkinElmer).

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 4.

Được xác nhận rằng dBBAT119-P253 bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 ở người khi có mặt ADP β S. Điều này cho thấy khả năng dBBAT119-P253 thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 của người theo cách phụ thuộc vào phân tử nhỏ như ATP, ADP hoặc AMP.

Ví dụ 3: Sự tăng cường hoạt tính liên kết của các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt phân tử nhỏ bằng cách sử dụng các thư viện chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được thiết kế một cách hợp lý

(3-1) Sự hình thành thư viện để tăng cường hoạt tính liên kết bằng cách sử dụng thư viện chuỗi nhẹ được thiết kế một cách hợp lý

Đối với thư viện kháng thể chứa số lượng lớn kháng thể thu được ở Ví dụ 2-2-1 có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP, sự tăng cường hoạt tính liên kết được thực hiện bằng cách tái tạo thư viện chuỗi nhẹ của kháng thể.

Các vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể được thiết kế một cách hợp lý được tạo thành trong patent WO2015/083764 trước đó được sử dụng để hình thành thư viện chuỗi nhẹ của kháng thể và thư viện chuỗi nặng của kháng thể để tăng cường hoạt tính liên kết.

Chúng được đưa vào thư viện chuỗi nhẹ hoặc các vùng chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của thư viện vector phagemid nêu trên thu được ở Ví dụ 2-2-1, và được đưa vào chủng *E. coli* ER2738 bằng quá trình điện di.

(3-2) Sự tăng cường hoạt tính liên kết của các kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP bằng cách sử dụng thư viện được thiết kế một cách hợp lý

Các thể thực khuẩn được tạo ra bằng phương pháp chung từ *E. coli* mang phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành. Cụ thể là, *E. coli* mang vector phagemid đã tạo thành được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015/046554) hoặc M13KO7ΔpIII (hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn thu được từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Dung dịch thư viện thể thực khuẩn thu được bằng cách pha loãng bằng TBS quần thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện. BSA sau đó được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện bằng cách sử dụng kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm. Các hạt được phủ NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated), các hạt NeutrAvidin (TAMAGAWA SEIKI) hoặc Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng làm các hạt nam châm. Đối với kháng nguyên, hCD137-Fc được biotin hóa được sử dụng.

Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện để thu được một cách hiệu quả các kháng thể chuyển phân tử nhỏ phụ thuộc vào phân tử nhỏ mà có thể đóng vai trò chuyển ở các mô ung thư. Cụ thể là, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt adenosin triphosphat (adenosin 5'-triphosphat; ATP) là phân tử nhỏ, và không liên kết với kháng nguyên khi không có ATP được thực hiện dựa vào phương pháp được mô tả trong patent WO2015/083764 trước đó.

(3-3) Đánh giá hoạt tính liên kết khi có và không có mặt ATP bằng ELISA thể thực khuẩn

Từ các khuẩn lạc đơn lẻ của *E. coli* thu được sau mỗi vòng bằng các phương pháp được mô tả ở trên, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy chứa thể thực khuẩn được thu thập bằng phương pháp thông thường (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-

145). Hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có và không có mặt ATP sau đó được xác nhận bởi ELISA thể thực khuẩn bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2-2-2.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 5.

Số lượng dòng vô tính thu được mà được đánh giá là các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP, với tỷ lệ hấp thụ S/N cao hơn 2 khi có mặt/không có mặt kháng nguyên và tỷ lệ hấp thụ S/N cao hơn 2 khi có mặt/không có mặt ATP (các dòng vô tính chuyển).

Ví dụ 4: Sản xuất các kháng thể CD137 được cải biến và đánh giá hoạt tính của chúng

(4-1) Sự tăng hoạt tính liên kết do sự biến đổi của dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib

Các biến thể của vùng biến đổi chuỗi nặng, dBBAT119H, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, dBBAT119L, của kháng thể kháng CD137 (tên dòng vô tính: dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib) thu được ở Ví dụ 2-4, được tạo ra bởi phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, chẳng hạn như PCR. Đối với vùng biến đổi chuỗi nặng, các biến thể được tạo ra trong đó D10 (đề cập đến axit aspartic (Asp) tại vị trí 10 (theo cách đánh số Kabat)) và G17 (đề cập đến glyxin (Gly) tại vị trí 17 (theo cách đánh số Kabat)) của dBBAT119H được thay thế bằng glyxin (Gly) và serin (Ser), tương ứng, để tạo ra dBBAT119H010; và N99 (đề cập đến asparagin (Asn) tại vị trí 99 (theo cách đánh số Kabat)), M100a (đề cập đến methionin (Met) tại vị trí 100a (theo cách đánh số Kabat)), và N100b (đề cập đến asparagin (Asn) tại vị trí 100b (theo cách đánh số Kabat)) của dBBAT119H010 được thay thế bằng các axit amin khác. Đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ, các biến thể được tạo ra trong đó F87 (đề cập đến phenylalanin (Phe) tại vị trí 87 (theo cách đánh số Kabat)) của dBBAT119L được thay thế bằng tyrosin (Tyr) để tạo ra dBBAT119L010; và D27b (đề cập đến aspartat (Asp) tại vị trí 27b (theo cách đánh số Kabat)), N31 (đề cập đến asparagin (Asn) tại vị trí 31 (theo cách đánh số Kabat)), và D94 (đề cập đến aspartat (Asp) tại vị trí 94 (theo cách đánh số Kabat)) của dBBAT119L010 được thay thế bằng các axit amin khác.

Đối với các biến thể của vùng biến đổi chuỗi nặng, hoạt tính liên kết với CD137 của người được đo bằng BiacoreT200 (GE Healthcare), bộ phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt. Các kháng thể bị bắt giữ bởi sự tương tác giữa các biến thể được tinh chế với chip cảm biến Series S CM3 được giữ cố định bởi Protein G (CALBIOCHEM) (GE Healthcare). Dung dịch CD137 của người được bổ sung ATP (FXa được tiêu hóa) hoặc dung dịch CD137 của người (FXa được tiêu hóa) mà không có ATP sau đó được tương tác khi có mặt ATP và khi không có ATP để đánh giá hoạt tính liên kết của các biến thể đối với CD137 của người (FXa được tiêu hóa). Các phép đo được thực hiện ở 25°C bằng cách sử dụng 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, và 2 mM MgCl₂, pH 7,4 làm hệ đệm chạy. Các kết quả đo cho thấy biến thể L100a (biến thể trong đó methionin (Met) tại vị trí 100a (theo cách đánh số Kabat) được thay thế bằng leuxin (Leu)) có hoạt tính liên kết với CD137 của người được tăng cường chỉ khi có mặt ATP (Fig. 6). Vùng biến đổi chuỗi nặng của biến thể L100a là dBBATk119H024 (SEQ ID NO: 132). Lượng liên kết của CD137 của người được điều chỉnh bởi lượng bắt giữ (1000 RU) của mỗi biến thể.

Đối với các biến thể của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, hoạt tính liên kết với CD137 của người (FXa được tiêu hóa) được xác định bằng BiacoreT200 trong các điều kiện tương tự như được mô tả ở trên. Các kết quả đo cho thấy biến thể E94 (biến thể trong đó aspartat (Asp) tại vị trí 94 (theo cách đánh số Kabat) được thay thế bằng glutamat (Glu)) có hoạt tính liên kết với CD137 của người được tăng cường chỉ khi có mặt ATP (Fig. 6). Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của biến thể E94 là dBBATk119L020 (SEQ ID NO: 133).

Các biến thể này kết hợp các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này được viết ngắn gọn là dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib (vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 132; vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 133; vùng hằng định chuỗi nặng SEQ ID NO: 93; và vùng hằng định chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 63).

Các kháng thể trong bản mô tả được xác định theo quy định sau: (vùng biến đổi chuỗi nặng)-(vùng hằng định chuỗi nặng)/(vùng biến đổi chuỗi nhẹ)-(vùng hằng định chuỗi nhẹ).

Ví dụ, tên kháng thể là dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib, có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể là dBBAT119H, vùng hằng định chuỗi

nặng là P253, vùng biến đổi chuỗi nhẹ là dBBAT119L, và vùng hằng định chuỗi nhẹ là LamLib.

(4-2) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến *in vitro* sử dụng các tế bào T của người

(4-2-1) Sự phát triển các môi trường nuôi cấy tế bào T của người

Các tế bào T người được khuếch đại và được nuôi cấy như được mô tả trong Ví dụ 2-6-1.

(4-2-2) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 *in vitro* bằng cách sử dụng các tế bào T người

Các phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2-6-2 đánh giá sự sản sinh IFN- γ khi có mặt NS1-P253 (kháng thể không chuyển), dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib, dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib, hoặc kháng thể đối chứng, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 ở nồng độ 10, 2, 0,4, 0,08, và 0,016 $\mu\text{g/ml}$, tương ứng. Sự sản sinh IFN- γ trong môi trường ADPbetaS-minus cũng được đánh giá.

Cả hai kết quả được thể hiện trên Fig. 7.

dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib được cải biến bộc lộ hoạt tính chủ vận phụ thuộc ADPbetaS mạnh hơn so với dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib. Điều này cho thấy khả năng dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 của người phụ thuộc ATP, ADP, và AMP mạnh hơn so với dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib.

Ví dụ 5: Các cải biến khác của các kháng thể CD137

(5-1) Tìm kiếm các cải biến làm tăng hoạt tính liên kết bằng cách đưa vào các cải biến toàn diện

Để tạo ra các kháng thể kháng CD137 tốt, các cải biến axit amin được đưa một cách toàn diện vào vùng biến đổi chuỗi nặng, dBBATk119H024, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, dBBATk119L020, của các kháng thể kháng CD137 được tạo ra trong các ví dụ 4-1. Bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực này, chẳng hạn như PCR, mỗi biến thể được tạo ra trong đó mỗi gốc axit amin của tất cả các gốc axit amin tạo thành CDR của dBBATk119H024 và dBBATk119L020 được thay thế bằng toàn bộ 18 axit amin ngoại trừ xystein. Các phép đo của khoảng 1200 biến thể được tạo ra để liên kết với CD137 của người được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore4000. Các kháng thể bị bắt giữ bởi sự tương tác giữa các chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy của biến thể với chip cảm biến Series S CM3 được giữ cố định bởi Protein G (CALBIOCHEM) (GE Healthcare). Dung dịch CD137 của người được bổ sung phân tử nhỏ (ATP) hoặc dung dịch CD137 của người không bổ sung phân tử nhỏ sau đó được tương tác khi có mặt phân tử nhỏ hoặc khi không có phân tử nhỏ để đánh giá hoạt tính liên kết của các kháng thể đối với CD137 của người. Các phép đo được thực hiện ở 25°C bằng cách sử dụng hệ đệm chạy được bổ sung CaCl₂ gồm 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0,02% Tween20, và 2 mM MgCl₂, pH 7,4.

(5-2) Sự tăng liên kết ATP

Gen chuỗi nặng của kháng thể A002-P253 (SEQ ID NO: 134) được tạo ra bằng cách kết hợp các cải biến được phát hiện trong Ví dụ 5-1 mà làm tăng hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt phân tử nhỏ, trong gen dBBATk119H024-P253 có dBBATk119H024 (SEQ ID NO: 132) là vùng biến đổi chuỗi nặng, và P253 (SEQ ID NO: 93) là vùng hằng định chuỗi nặng được tạo ra bằng cách đưa cải biến S267E/L328F vào và xóa bỏ Gly và Lys tận cùng C từ IgG1 người. Gen chuỗi nhẹ của kháng thể B040-Lamlib (SEQ ID NO: 135) cũng được tạo ra bằng cách kết hợp các cải biến được phát hiện trong Ví dụ 5-1 mà làm tăng hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt phân tử nhỏ, trong chuỗi nhẹ của kháng thể dBBATk119L020-Lamlib có dBBATk119L020 (SEQ ID NO: 133) là vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi λ Lamlib của người (SEQ ID NO: 63) là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Các gen này được kết hợp để biểu hiện và tinh chế các kháng thể bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tạo ra kháng thể kháng CD137 quan tâm, A002-P253/B040-Lamlib. Vùng biến đổi chuỗi nặng của A002-P253/B040-Lamlib là A002 (SEQ ID NO: 136), vùng biến đổi chuỗi nhẹ là B040 (SEQ ID NO: 137), vùng hằng định chuỗi nặng là P253 (SEQ ID NO: 93), và vùng hằng định chuỗi nhẹ là chuỗi λ Lamlib của người (SEQ ID NO: 63).

Đối với vùng biến đổi chuỗi nặng của A002-P253/B040-Lamlib được tạo ra trong đoạn này, các biến thể khác nhau được tạo ra trong đó các axit amin thứ 53, 54 hoặc 55 theo cách đánh số Kabat được thay thế bằng các axit amin khác với mục đích làm tăng hoạt tính liên kết với ATP. Bảng 15 thể hiện các cải biến axit amin (theo cách đánh số Kabat) từ A002 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể được tạo ra.

Bảng 15

Vùng biến đổi chuỗi nặng	Sự biến đổi axit amin từ A002 (theo cách đánh số Kabat)
A002	—
A146	S54A / N55S
A159	R53S / N55S
A160	R53T / N55S
A161	R53Q / N55S
A162	R53K / N55S
A163	R53H / N55S
A164	R53S / N55T
A165	R53T / N55T
A166	R53Q / N55T
A167	R53K / N55T
A168	R53H / N55T
A169	R53S / N55H
A170	R53T / N55H
A171	R53Q / N55H

Hoạt tính liên kết của các biến thể được tạo ra đối với ATP và CD137 của người được đánh giá bằng Biacore T200.

Phép đo hoạt tính liên kết với ATP được thực hiện ở 37°C sử dụng 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, và 0,05% Tween20 làm hệ đệm chạy. Đầu tiên, các kháng thể bị bắt giữ bởi tương tác giữa các dung dịch kháng thể được điều chế trong hệ đệm chạy với chip cảm biến Series S CM3 (GE Healthcare) được giữ cố định bằng Sure Protein A (GE Healthcare). Hoạt tính liên kết của các kháng thể sau đó được đánh giá bằng sự tương tác với dung dịch ATP được điều chế trong

hệ đệm chạy. Chip này được tái tạo bằng cách sử dụng 25 mM NaOH và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5), và phép đo được thực hiện bằng cách bắt giữ lặp đi lặp lại các kháng thể. Lượng liên kết ATP đối với mỗi kháng thể được tính toán bằng cách điều chỉnh lượng liên kết ATP khi được tiêm ở nồng độ 100 nM bằng lượng kháng thể bắt giữ trên bề mặt chip là lượng ATP trên mỗi đơn vị lượng kháng thể.

Phép đo hoạt tính liên kết với CD137 của người được thực hiện ở 37°C sử dụng 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, và 0,05% Tween20 làm hệ đệm chạy. Đầu tiên, các kháng thể bị bắt giữ bởi tương tác giữa các dung dịch kháng thể được điều chế trong hệ đệm chạy với chip cảm biến Series S CM3 (GE Healthcare) được giữ cố định bằng Sure Protein A (GE Healthcare). Sau đó, hoạt tính liên kết với CD137 của người được đánh giá bằng tương tác với dung dịch CD137 của người được bổ sung 100 μ M ATP ở dạng phân tử nhỏ. Đối với kháng nguyên CD137 của người, hCD137-HisBAP được điều chế trong Ví dụ (1-1) được sử dụng, và các phép đo được thực hiện ở nồng độ kháng nguyên là 0, 15,625, 62,5, 250 hoặc 1000 nM. Chip này được tái tạo bằng cách sử dụng 25 mM NaOH và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5), và phép đo được thực hiện bằng cách bắt giữ lặp đi lặp lại các kháng thể. Hằng số phân ly (KD) của các kháng thể tương ứng đối với CD137 của người được tính toán bằng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Cụ thể là, hằng số tốc độ liên kết k_a (L/mol/giây) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/giây) được tính toán bằng phương pháp vẽ theo điểm toàn bộ biểu đồ thu được bằng phép đo sử dụng mẫu liên kết Langmuir 1:1, và hằng số phân ly KD (mol/L) được tính toán từ các giá trị này.

Bảng 16 thể hiện các kết quả của các phép đo này.

Phân tích khả năng liên kết với ATP và CD137 của người

Bảng 16

Tên kháng thể	Liên kết với ATP	Thông số để liên kết với CD137 của người (ATP = 100 μ M)		
		k_a	k_d	KD
A002-P253/B040-Lamlib	-0,0001	3,94E+04	2,89E-03	7,35E-08
A146-P253/B040-Lamlib	-0,0001	7,80E+04	2,32E-02	2,97E-07

A159-P253/B040-Lamlib	0,0013	8,21E+04	3,83E-02	4,66E-07
A160-P253/B040-Lamlib	-0,0001	9,59E+03	2,46E-02	2,56E-06
A161-P253/B040-Lamlib	0,0010	1,87E+04	2,35E-02	1,25E-06
A162-P253/B040-Lamlib	0,0002	1,47E+05	3,17E-02	2,16E-07
A163-P253/B040-Lamlib	0,0016	5,60E+04	1,36E-02	2,43E-07
A164-P253/B040-Lamlib	0,0017	9,81E+04	4,38E-02	4,46E-07
A165-P253/B040-Lamlib	0,0002	1,14E+04	1,96E-02	1,72E-06
A166-P253/B040-Lamlib	0,0011	1,21E+04	1,92E-02	1,59E-06
A167-P253/B040-Lamlib	0,0001	8,45E+04	3,96E-02	4,69E-07
A168-P253/B040-Lamlib	0,0017	7,01E+04	1,81E-02	2,58E-07
A169-P253/B040-Lamlib	0,0011	1,15E+04	5,88E-03	5,11E-07
A170-P253/B040-Lamlib	0,0000	5,13E+03	5,36E-03	1,04E-06
A171-P253/B040-Lamlib	0,0012	4,93E+03	5,24E-03	1,06E-06

Như được thể hiện trong Bảng 16, các biến thể trong đó các axit amin thứ 53, 54 hoặc 55 (theo cách đánh số Kabat) của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng các axit amin khác có hoạt tính liên kết với ATP tăng so với kháng thể A002-P253/B040-Lamlib trước khi cải biến, ngoại trừ A146-P253/B040-Lamlib và A160-P253/B040-Lamlib. Sự so sánh hằng số tốc độ phân ly k_a (L/mol/giây) cũng thể hiện hằng số tốc độ phân ly đối với CD137 của người đã tăng đối với A146-P253/B040-Lamlib, A159-P253/B040-Lamlib, A162-P253/B040-Lamlib, A163-P253/B040-Lamlib, A164-P253/B040-Lamlib, A167-P253/B040-Lamlib và A168-P253/B040-Lamlib trong số các kháng thể được đánh giá ở trên.

(5-3) Sự tăng hoạt tính liên kết bằng cách đưa vào các cải biến toàn diện

Để tạo ra các kháng thể kháng CD137 tốt hơn, các cải biến được phát hiện trong Ví dụ 5-1 mà làm tăng hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt phân tử nhỏ và làm giảm liên kết với CD137 của người ở các điều kiện mà không có phân tử nhỏ, và các cải biến được phát hiện trong Ví dụ 5-2 làm tăng hoạt tính liên kết với ATP và làm tăng hằng số tốc độ phân ly đối với CD137 của người được kết hợp để tạo ra các kháng thể kháng CD137 của người bộc lộ profin tốt hơn. Các gen chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra kết hợp các cải biến được phát hiện trong các ví dụ 5-1 và 5-2 trong gen chuỗi nặng của kháng thể A002-G1T3 có A002 (SEQ ID NO: 136) là vùng biến đổi chuỗi nặng, và G1T3 (SEQ ID NO: 138) là vùng hằng định chuỗi nặng được tạo ra bằng cách đưa cải biến K214R/Q419E vào và xóa bỏ Gly và Lys tận cùng C từ IgG1 người. Gen chuỗi nhẹ của kháng thể được tạo ra bằng cách kết hợp các cải biến được phát hiện trong Ví dụ 5-1 trong chuỗi nhẹ của kháng thể B040-Lamlib có B040 (SEQ ID NO: 137) là vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi λ Lamlib của người là vùng hằng định chuỗi nhẹ.

Đối với đối tượng để so sánh, gen chuỗi nặng của kháng thể 20H4.9-P253 có vùng biến đổi chuỗi nặng 20H4.9 (SEQ ID NO: 139) của kháng thể kháng CD137 hiện có được mô tả trong US8137667 và P253 (SEQ ID NO: 93) là vùng hằng định chuỗi nặng; và gen chuỗi nhẹ của kháng thể kết hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ 20H4.9LC (SEQ ID NO: 140) với chuỗi κ người k0 (SEQ ID NO: 141) là vùng hằng định chuỗi nhẹ được tạo ra. Đối với đối tượng khác để so sánh, gen chuỗi nặng của kháng thể MOR-7480.1H-P253 có vùng biến đổi chuỗi nặng MOR-7480.1H (SEQ ID NO: 142) tạo thành kháng thể kháng CD137 MOR-7480.1 hiện có được mô tả trong US8337850, và P253 (SEQ ID NO: 93) là vùng hằng định chuỗi nặng; và chuỗi nhẹ của kháng thể MOR-7480.1L-lam kết hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ MOR-7480.1L (SEQ ID NO: 143) với chuỗi λ lam của người (SEQ ID NO: 63) là vùng hằng định chuỗi nhẹ, được tạo ra (lưu ý: cả chuỗi λ Lamlib của người và lam đều có cùng trình tự axit amin (SEQ ID NO: 63)).

Các gen này được kết hợp để biểu hiện và tinh chế các kháng thể bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tạo ra kháng thể kháng CD137 quan tâm. Bảng 17 là danh sách trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng hằng định chuỗi nặng, vùng hằng định chuỗi nhẹ, và vùng siêu biến (Hyper Variable Region; còn được đề cập đến là HVR hoặc CDR) của các kháng thể được tạo ra.

Các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và vùng siêu biến của chúng (được chỉ ra bằng số ID trình tự)

Bảng 17

Tên kháng thể	Vùng biến đổi		Vùng hằng định		Vùng siêu biến (HVR)					
	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375-G1T3/ B167-Lamlib	43	54	138	63	7	8	17	21	26	27
A372-G1T3/ B040-Lamlib	44	55	138	63	7	9	17	22	26	27
A356-G1T3/ B040-Lamlib	45	55	138	63	7	10	17	22	26	27
A486-G1T3/ B167-Lamlib	46	54	138	63	7	11	18	21	26	27
A487-G1T3/ B167-Lamlib	47	54	138	63	7	8	18	21	26	27
A488-G1T3/ B226-Lamlib	48	56	138	63	7	12	18	21	26	28
A489-G1T3/ B223-Lamlib	49	57	138	63	7	13	18	21	26	29
A548-G1T3/ B376-Lamlib	50	58	138	63	7	14	19	23	26	27
A551-G1T3/ B256-Lamlib	51	59	138	63	7	15	20	24	26	27
A551-G1T3/ B379-Lamlib	51	60	138	63	7	15	20	25	26	27
A555-G1T3/ B379-Lamlib	52	60	138	63	7	16	20	25	26	27
A548-G1T3/ B256-Lamlib	50	59	138	63	7	14	19	24	26	27
A549-G1T3/ B167-Lamlib	53	54	138	63	7	14	17	21	26	27

Khả năng liên kết của các biến thể được tạo ra với ATP và với CD137 của người được đánh giá bằng Biacore T200. Các phép đo khả năng liên kết với CD137 của người được thực hiện ở 37°C sử dụng 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, và 0,05% Tween20 làm hệ đệm chạy. Đầu tiên, 250-400 RU kháng thể bị bắt giữ bởi tương tác giữa các dung dịch kháng thể được điều chế trong hệ đệm chạy với chip cảm biến Series S CM3 (GE Healthcare) được giữ cố định bằng Sure Protein A (GE Healthcare). Hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt ATP hoặc khi không có ATP sau đó được đánh giá bằng tương tác với dung dịch CD137 của người được điều chế trong hệ đệm chạy được bổ sung nồng độ ATP mong muốn, hoặc dung dịch CD137 của người được điều chế trong hệ đệm chạy mà không có ATP. Đối với kháng nguyên CD137 của người, hCD137-HisBAP được điều chế trong Ví dụ (1-1) được sử dụng, và các phép đo giá trị KD được thực hiện ở nồng độ kháng nguyên là 0, 15,625, 62,5, 250 hoặc 1000 nM. Đối với việc đánh giá lượng liên kết, các phép đo được thực hiện ở nồng độ kháng nguyên là 0 và 1000 nM. Chip này được tái tạo bằng cách sử dụng 25 mM NaOH và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5), và phép đo được thực hiện bằng cách bắt giữ lặp đi lặp lại các kháng thể. Hằng số phân ly của các kháng thể tương ứng đối với CD137 của người được tính toán bằng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Cụ thể là, hằng số tốc độ liên kết k_a (L/mol/giây) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/giây) được tính toán bằng phương pháp vẽ theo điểm toàn bộ biểu đồ thu được bằng phép đo sử dụng mẫu liên kết Langmuir 1:1, và hằng số phân ly KD (mol/L) được tính toán từ các giá trị này.

Bảng 18 thể hiện các kết quả của các phép đo này.

Phân tích khả năng liên kết của các kháng thể được cải biến với CD137 của người

Bảng 18

Tên kháng thể	Liên kết với CD137 người						K _D (M) đối với CD137 người					
	Không có ATP	ATP = 1 μ M	ATP = 10 μ M	ATP = 100 μ M	ADP = 10 μ M	AMP = 10 μ M	Không có ATP	ATP = 1 μ M	ATP = 10 μ M	ATP = 100 μ M	ADP = 10 μ M	AMP = 10 μ M
20H4.9-P253/20H4.9LC-K0	0,280	0,283	0,283	0,283	0,287	0,287	2,68E-08	2,17E-08	2,03E-08	2,04E-08	1,90E-08	2,17E-08
MOR-7480.1H-P253/ MOR-7480.1L-lam	0,260	0,261	0,261	0,261	0,266	0,266	8,22E-08	8,40E-08	7,50E-08	6,31E-08	7,30E-08	8,46E-08
A375-G1T3/B167-Lamlib	0,053	0,179	0,255	0,275	0,280	0,276	N.A.	4,43E-07	6,17E-08	1,35E-08	5,43E-09	8,91E-09
A372-G1T3/B040-Lamlib	0,017	0,135	0,242	0,269	0,284	0,245	N.A.	1,14E-06	1,58E-07	5,25E-08	9,36E-09	1,47E-07
A356-G1T3/B040-Lamlib	0,008	0,083	0,211	0,262	0,278	0,255	N.A.	N.A.	4,90E-07	1,19E-07	3,31E-08	1,34E-07
A486-G1T3/B167-Lamlib	0,128	0,260	0,282	0,292	0,294	0,289	1,04E-06 *	7,30E-08	1,08E-08	3,22E-09	2,48E-09	4,33E-09
A487-G1T3/B167-Lamlib	0,110	0,229	0,270	0,282	0,283	0,279	1,43E-06 *	1,63E-07	2,70E-08	7,33E-09	3,01E-09	3,86E-09
A488-G1T3/B226-Lamlib	0,042	0,135	0,232	0,268	0,281	0,261	N.A.	4,24E-07	1,33E-07	5,77E-08	1,60E-08	6,80E-08
A489-G1T3/B223-Lamlib	0,004	0,095	0,214	0,257	0,276	0,261	N.A.	4,42E-06	3,45E-07	1,59E-07	5,45E-08	1,05E-07
A548-G1T3/B376-Lamlib	0,012	0,149	0,245	0,270	0,270	0,262	N.A.	6,75E-07	7,69E-08	1,53E-08	1,55E-08	3,71E-08
A551-G1T3/B256-Lamlib	0,006	0,133	0,254	0,285	0,285	0,275	N.A.	1,23E-06	1,44E-07	2,91E-08	2,81E-08	6,12E-08
A551-G1T3/B379-Lamlib	0,014	0,173	0,271	0,290	0,291	0,283	N.A.	5,59E-07	7,17E-08	1,58E-08	1,51E-08	3,25E-08
A555-G1T3/B379-Lamlib	0,017	0,180	0,267	0,282	0,282	0,274	N.A.	4,77E-07	5,84E-08	1,35E-08	1,31E-08	2,75E-08
A548-G1T3/B256-Lamlib	0,009	0,156	0,257	0,284	0,287	0,276	N.A.	9,31E-07	1,08E-07	2,63E-08	2,14E-08	4,61E-08
A549-G1T3/B167-Lamlib	0,048	0,209	0,261	0,277	0,279	0,272	N.A.	2,04E-07	2,83E-08	6,12E-09	5,53E-09	1,35E-08

N.A: Quá yếu để xác định giá trị K_D

* Giá trị K_D được xác định bằng mẫu trạng thái ổn định

Các giá trị “khả năng liên kết với CD137 của người” trong Bảng 18 nêu trên chỉ ra lượng liên kết của CD137 của người trên mỗi đơn vị lượng kháng thể khi

CD137 của người được cho phép tương tác ở nồng độ 1000 nM ở mỗi điều kiện nồng độ ATP được mô tả ở trên, và “ K_D (M) đối với CD137 của người” chỉ ra hằng số phân ly đối với CD137 của người ở mỗi điều kiện nồng độ ATP. Các giá trị K_D được đánh dấu * trong bảng được tính toán bằng mô hình trạng thái ổn định. Lượng liên kết của tất cả các biến thể được tạo ra khi có mặt 10 μ M ATP là lớn hơn lượng liên kết ở điều kiện trong đó ATP có ở 1 μ M, và thậm chí lớn hơn khi có mặt 100 μ M, cho thấy rằng chúng liên kết với CD137 của người theo cách phụ thuộc nồng độ ATP. Mặt khác, các đối tượng để so sánh, 20H4.9-P253/20H4.9LC-k0 và MOR-7480.1 H-P253/MOR-7480.1L-lam, không thể hiện liên kết với CD137 của người theo cách phụ thuộc nồng độ ATP.

(5-4) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP in vitro của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến bằng cách sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị 4-1BB Jurkat

Dòng tế bào GloResponse™ NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004) được sử dụng để đo hoạt tính *in vitro* của các biến thể được tạo ra. Mỗi 200 μ L tế bào Fc γ RIIB CHO-K1 (Promega) được điều chế ở nồng độ 5×10^4 /mL với môi trường được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng và để yên qua đêm ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Môi trường nuôi cấy CHO (90% Ham's F12, 10% FBS) được sử dụng cho môi trường nuôi cấy. Sau đó, sau khi tất cả môi trường được hút đi, 25 μ L dòng tế bào GloResponse™ NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chế đến nồng độ 2×10^6 /mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Sau đó, mỗi 25 μ L dung dịch kháng thể được pha loãng bằng môi trường thử nghiệm được bổ sung để nồng độ cuối cùng là 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, và 10 μ g/mL; và cuối cùng 25 μ L dung dịch ATP được pha loãng bằng môi trường thử nghiệm được bổ sung để nồng độ cuối cùng là 0 và 250 μ M. Các đĩa được để yên trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂ và 15 phút ở nhiệt độ phòng; và 75 μ L thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang của giếng không thêm kháng thể là đơn vị sáng tương đối (số lần cảm ứng) và đóng vai trò là chỉ số để đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 8.

(5-5) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP in vitro của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến bằng cách sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người

(5-5-1) Sự phân lập các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) ở người được phân lập từ các mẫu máu của các tình nguyện viên khỏe mạnh trong công ty của Chủ đơn được phân lập như được mô tả trong Ví dụ 2-6-1. Sau đó, các tế bào được pha loãng trong môi trường (5% huyết thanh người (SIGMA), 95% AIM-V (Thermo Fischer Scientific) ở mật độ tế bào là $5 \times 10^6/\text{mL}$.

(5-5-2) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người được điều chỉnh tới mật độ tế bào $5 \times 10^6/\text{mL}$ và được cấy vào các đĩa đáy phẳng đa giếng 96 giếng (Corning) ở nồng độ 100 μL mỗi giếng. Sau đó, 50 μL kháng thể kháng CD3 ϵ người 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BD, dòng vô tính SP34) và kháng thể kháng CD28 người 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BD, dòng vô tính: CD28. 2) được pha loãng trong môi trường được bổ sung vào. Các đĩa được lắc và sau đó để yên trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 6 giờ. Sau đó mỗi giếng được bổ sung 25 μL môi trường ATP (SIGMA) 2 mM hoặc môi trường không có ATP và 25 μL của mỗi kháng thể ở nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, và các đĩa được lắc trước khi để yên trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 18 giờ. Sau đó, phần chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập, và chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng để định lượng hàm lượng IL-2 trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy sử dụng bộ kit IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) của người hoặc Set IL-2 ELISA (BD Biosciences) của người. Sau khi thu thập chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy, các đĩa lại được để yên trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, phần chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập, và lượng IFN- γ có trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được định lượng sử dụng bộ kit IFN- γ DuoSet ELISA (R&D systems) của người hoặc bộ kit phát triển IFN- γ ELISA ở người (PeproTech). ELISA thường được thực hiện theo quy trình đi kèm theo bộ kit. Đối với bộ kit IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) của người và bộ kit IFN- γ DuoSet

ELISA (R&D systems) của người, quá trình hiện màu và kết thúc quá trình hiện màu được thực hiện theo các quy trình sử dụng dung dịch chất nền (R&D systems) chứa H_2O_2 và tetramethylbenzidin, và 1N H_2SO_4 (Wako). Đối với bộ IL-2 ELISA của người (BD Biosciences), quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách sử dụng 1N H_2SO_4 (Wako). Đối với bộ kit phát triển IFN- γ ELISA (PeproTech), dung dịch nhuộm sắc thể TMB (Thermo Fischer Scientific) và 1N H_2SO_4 (Wako) được sử dụng cho quá trình hiện màu và kết thúc quá trình hiện màu. Các phép đo độ hấp thụ sau đó được thực hiện bằng EnVision (PerkinElmer).

Các kết quả được nêu chi tiết trong Ví dụ 5-5-3 và sau đó.

(5-5-3) Đánh giá sự tăng cường hoạt tính chủ vận của vùng hằng định chuỗi nặng bằng cách tăng hoạt tính liên kết với thụ thể $\text{Fc}\gamma$

Bằng cách đánh giá *in vitro* sử dụng bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi ở người như được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2, đánh giá hiệu quả của việc sử dụng P587, MY518, TT14, và TT16 làm tăng hoạt tính liên kết $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ của vùng hằng định chuỗi nặng khác nhau trên hoạt tính chủ vận CD137.

Các kháng thể được đánh giá như được thể hiện trong Bảng 19.

Sự sản sinh các kháng thể được nêu trong Bảng 19 được mô tả trong Ví dụ 7-1. So với lượng IL-2 và IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy khi kháng thể đối chứng âm (IC17HdK-MY518/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0) được bổ sung khi có mặt 250 μM ATP, khi việc bổ sung kháng thể làm tăng lượng IL-2 trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy là 1,05 lần trở lên và lượng IFN- γ là 1,15 lần trở lên, nó được đánh giá là kháng thể này chứng minh được hoạt tính chủ vận CD137. Phép đo hoạt tính chủ vận sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) ở người có thể khác nhau giữa người cho và mẫu máu của người cho. Theo quan điểm này, đã xác định được rằng các kháng thể mà không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 đối với một số hoặc nhiều hơn một nửa PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho có thể được đánh giá là không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137, ngay cả khi chúng đáp ứng các tiêu chuẩn về hoạt tính chủ vận đối với phần khác của PBMC của người.

Các kháng thể được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt 250 μM ATP được thể hiện trong Bảng 19. Điều này chỉ ra rằng hoạt tính chủ vận

CD137 được tăng cường bằng cách kết hợp TT16 với P587 mà làm tăng hoạt tính liên kết FcγRIIb của vùng hằng định chuỗi nặng (Fig. 9 và Fig. 10). Người ta cho rằng hoạt tính chủ vận được tăng cường bằng cách tăng hoạt tính liên kết đối với các tế bào biểu hiện FcγRIIb, mà là các khung liên kết chéo cần thiết để kháng thể bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với các tế bào biểu hiện CD137 (xem Protein Eng Des Sel. 2013 Oct; 26(10): 589-598. Công bố trực tuyến ngày 05 tháng 06 năm 2013. doi:10.1093/protein).

Bảng 19

Tên kháng thể được đánh giá	Tên kháng thể được đánh giá là có hoạt tính khi có mặt ATP
A375-MY518/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib	
A356-TT16/B040-LamLib	
A375-TT14/B167-LamLib	

(5-5-4) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP của các vùng biến đổi

Hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP của mỗi vùng biến đổi bằng cách kết hợp các vùng hằng định chuỗi nặng P587 và P253 với các vùng biến đổi khác nhau được đánh giá bằng cách đánh giá *in vitro* sử dụng bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi ở người như được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2.

Các kháng thể được đánh giá như được thể hiện trong Bảng 20. Sự sản sinh các kháng thể được nêu trong Bảng 20 được mô tả trong Ví dụ 7-1. So với lượng IL-2 và IFN-γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy khi kháng thể đối chứng âm (IC17HdK-P253/IC17L-k0, IC17HdK-P587/IC17L-k0) được bổ sung khi có mặt 250 μM ATP, khi việc bổ sung kháng thể làm tăng lượng IL-2 trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy là 1,05 lần trở lên và lượng IFN-γ là 1,15 lần trở lên, nó được đánh giá là kháng thể này chứng minh được hoạt tính chủ vận CD137. Phép đo hoạt tính chủ vận sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) ở người có thể khác nhau giữa người cho và mẫu máu của người cho. Theo quan điểm này, đã xác định được rằng các kháng thể không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 đối với một số hoặc nhiều hơn một nửa PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho có thể được đánh giá là không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137, ngay cả khi chúng

đáp ứng các tiêu chuẩn về hoạt tính chủ vận đối với phần khác của PBMC của người. Các kháng thể được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt 250 μ M ATP như được thể hiện trong Bảng 20 (Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14 và Fig. 15).

Ngoài ra, trong số các kháng thể được đánh giá là thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt 250 μ M ATP, các kháng thể có số lần thay đổi liên quan đến nhóm được bổ sung kháng thể đối chứng âm (IC17HdK-P253/IC17L-k0, IC17HdK-P587/IC17L-k0) đối với cả lượng IL-2 và IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy ở điều kiện không có ATP nhỏ hơn số lần thay đổi liên quan đến kháng thể đối chứng âm ở các điều kiện khi có mặt 250 μ M ATP được đánh giá là có hoạt tính chủ vận CD137 thấp hơn ở điều kiện không có ATP. Các kháng thể mà thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt 250 μ M ATP và được đánh giá là có hoạt tính chủ vận CD137 thấp hơn khi không có ATP như được thể hiện trong Bảng 20 (Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14 và Fig. 15). Các kháng thể này được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP.

Từ những điều trên, đã xác nhận được rằng đối với các vùng biến đổi, sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ của (A375/B167), (A356/B040), (A372/B040), (A486/B167), (A488/B226), (A489/B223), (A551/B256), (A548/B256), và (A551/B379) bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 theo cách phụ thuộc ATP.

Bảng 20

Tên kháng thể được đánh giá	Tên kháng thể được đánh giá là có hoạt tính khi có mặt ATP	Tên kháng thể được đánh giá là có hoạt tính thấp khi không có mặt ATP
A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib
A486-P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib
A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib

(5-5-5) Đánh giá hiệu quả có thể có đối với hoạt tính chủ vận CD137 của việc kết hợp các thay đổi mà làm tăng pI của vùng hằng định chuỗi nặng với vùng hằng định chuỗi nặng có hoạt tính liên kết thụ thể Fc γ tăng

Hiệu quả đối với hoạt tính chủ vận CD137 của việc đưa vào các cải biến axit amin khác nhau mà làm tăng pI của vùng hằng định chuỗi nặng vào vùng hằng định chuỗi nặng có hoạt tính liên kết FcγRIIb tăng khác nhau được đánh giá bằng cách đánh giá *in vitro* sử dụng bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi ở người được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2. Các biến đổi axit amin mà làm tăng pI được đưa vào các vùng hằng định chuỗi nặng TT16, MY518, và TT14, và từ đó các vùng hằng định chuỗi nặng TT16+P343R/D413K (SCF028), TT16+Q311R/P343R (SCF033), MY518+P343R/D413K (SCF025), MY518+Q311R/P343R (SCF030), TT14+P343R/D413K (SCF027), và TT14+Q311R/P343R (SCF032) được tạo ra. Tên của các kháng thể được đánh giá trong đó các biến đổi axit amin mà làm tăng pI đã được đưa vào, và tên của các kháng thể tương ứng trước khi các biến đổi axit amin làm tăng pI được đưa vào như được thể hiện trong Bảng 21. Sự sản sinh các kháng thể được nêu trong Bảng 21 được mô tả trong Ví dụ 7-2.

Liên quan đến việc đánh giá sự tăng cường hoạt tính chủ vận bằng cách đưa vào các cải biến axit amin làm tăng pI, khi việc bổ sung kháng thể làm tăng lượng IL-2 là 1,04 lần trở lên và lượng IFN-γ là 1,1 lần trở lên trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy liên quan đến nhóm được bổ sung các kháng thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng không chứa các cải biến axit amin này, A375-TT16/B167-LamLib, A375-MY518/B167-LamLib, và A375-TT14/B167-LamLib, nó được đánh giá là hoạt tính chủ vận CD137 được tăng cường. So với các kháng thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng không có các cải biến axit amin làm tăng pI, các kháng thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng trong đó các cải biến axit amin thể hiện là có hoạt tính chủ vận CD137 được tăng cường khi có mặt 250 μM ATP được thể hiện trong Bảng 22 (Fig. 10).

Điều này chỉ ra rằng việc không phụ thuộc vào mức độ làm tăng hoạt tính liên kết FcγRIIb của vùng hằng định chuỗi nặng, việc đưa vào các cải biến làm tăng pI của vùng hằng định chuỗi nặng làm tăng cường hoạt tính chủ vận CD137 của kháng thể kháng CD137 của người. Đã có gợi ý rằng: việc kết hợp các cải biến làm tăng pI của vùng hằng định chuỗi nặng với các cải biến làm tăng khả năng liên kết FcγRIIb của vùng hằng định chuỗi nặng vào vùng hằng định chuỗi nặng làm tăng cường sự tương tác với bề mặt tế bào biểu hiện FcγRIIb tích điện âm; và các phức hợp miễn dịch của các kháng thể hoặc các kháng thể liên kết kháng nguyên tiếp cận bề mặt tế bào biểu hiện FcγRIIb gần hơn; và việc này còn làm tăng khả năng liên

kết với các tế bào biểu hiện FcγRIIb là các khung liên kết chéo cần thiết để các kháng thể bộc lộ hoạt tính chủ vận đối với các tế bào biểu hiện CD137; và do đó hoạt tính chủ vận được tăng cường thêm.

Bảng 21

Tên vùng hằng định chuỗi nặng được đánh giá trong đó các thay đổi axit amin làm tăng pI được đưa vào	Tên vùng hằng định chuỗi nặng tương ứng trước khi đưa vào các thay đổi axit amin làm tăng pI	Các thay đổi pI được đưa vào
A375-SCF028/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF033/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF027/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF032/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	Q311R/P343R

Bảng 22

Tên kháng thể được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận được tăng cường
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib

(5-5-6) Đánh giá hiệu quả đối với hoạt tính chủ vận bằng cách đưa vào các cải biến làm tăng pI của vùng hằng định chuỗi nặng

Hiệu quả đối với hoạt tính chủ vận CD137 của việc đưa vào các cải biến axit amin khác nhau mà làm tăng pI của các vùng hằng định chuỗi nặng MY201aPh và MY518 được đánh giá bằng cách đánh giá *in vitro* sử dụng bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi ở người được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2. Các vùng hằng định chuỗi nặng MY518, MY518a và MY201aPh được đưa vào cùng với các cải biến axit amin làm tăng pI; và MY518+P343R/D413K (SCF025), MY518+Q311R/P343R(SCF030), MY518+P343R(SCF039), MY518+D413K (SCF040), MY518a+Q311R (SCF060a), MY201aPh+P343R(SCF041aPh), MY201aPh+P343R/D413K (SCF043aPh), MY201aPh+Q311R (SCF056aPh), MY201aPh+Q311R/P343Rb(SCF057aPh), và MY201aPh+Q311R/D413K (SCF059aPh) từ đó được tạo ra. Tên của các kháng thể được đánh giá trong đó các biến đổi axit amin mà làm tăng pI đã được đưa vào, và tên của các kháng thể trước

khi các biến đổi axit amin làm tăng pI tương ứng được đưa vào như được thể hiện trong Bảng 23. Sự sản sinh các kháng thể được nêu trong Bảng 23 được mô tả trong Ví dụ 7-2.

Liên quan đến việc đánh giá sự tăng cường hoạt tính chủ vận bằng cách đưa vào các cải biến axit amin làm tăng pI, khi việc bổ sung kháng thể làm tăng lượng IL-2 là 1,04 lần trở lên và lượng IFN- γ là 1,1 lần trở lên trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy liên quan đến nhóm được bổ sung các kháng thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng không chứa các cải biến axit amin này, A375-MY518a/B167-LamLib và A375-MY201aPh/B167-LamLib, nó được đánh giá là hoạt tính chủ vận CD137 được tăng cường. So với các kháng thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng không có các cải biến axit amin làm tăng pI, các kháng thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng trong đó các thay đổi axit amin thể hiện là có hoạt tính chủ vận CD137 được tăng cường khi có mặt 250 μ M ATP được thể hiện trong Bảng 24 (Fig. 16 và 17).

Bảng 23

Tên vùng hằng định chuỗi nặng được đánh giá trong đó các thay đổi axit amin mà làm tăng pI đã được đưa vào	Tên vùng hằng định chuỗi nặng tương ứng trước khi đưa vào các thay đổi axit amin mà làm tăng pI	Các thay đổi pI được đưa vào
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	D413K
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R
A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/D413K

Bảng 24

Tên kháng thể được đánh giá là bậc lộ hoạt tính chủ vận được tăng cường
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib

(5-5-7) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP của các kháng thể kháng CD137 của người mà kết hợp các vùng biến đổi và các vùng hằng định được tạo ra

Hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP của các kháng thể kháng CD137 của người được thực hiện bằng cách kết hợp các vùng biến đổi có các vùng hằng định chuỗi nặng làm tăng pI được mô tả ở trên được đánh giá bằng cách đánh giá *in vitro* sử dụng bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi ở người được mô tả trong các ví dụ 5-5-1 và 5-5-2. Các kháng thể được đánh giá được thể hiện trong Bảng 25.

So với lượng IL-2 và IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy khi kháng thể đối chứng âm (IC17HdK-MY518a/IC17L-k0, IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0, IC17HdK-MY201/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0, IC17HdK-MY518/IC17L-k0, hoặc IC17HdK-TT16/IC17L-k0) được bổ sung khi có mặt 250 μ M ATP, khi việc bổ sung kháng thể làm tăng lượng IL-2 trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy là 1,05 lần trở lên và lượng IFN- γ là 1,15 lần trở lên, nó được đánh giá là kháng thể này chứng minh được hoạt tính chủ vận CD137. Phép đo hoạt tính chủ vận sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) ở người có thể khác nhau giữa người cho và mẫu máu của người cho. Theo quan điểm này, đã xác định được rằng các kháng thể không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 đối với một số hoặc nhiều hơn một nửa PBMC của người được phân lập từ nhiều người cho có thể được đánh giá là không thể hiện hoạt tính chủ vận CD137, ngay cả khi chúng đáp ứng các tiêu chuẩn về hoạt tính chủ vận đối với phần khác của PBMC của người. Các kháng thể được đánh giá là bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt 250 μ M ATP như được thể hiện trong Bảng 25 (Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18, Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22, và Fig. 23).

Ngoài ra, trong số các kháng thể được đánh giá là thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 khi có mặt 250 μ M ATP, các kháng thể có số lần thay đổi liên quan đến nhóm được bổ sung kháng thể đối chứng âm (IC17HdK-MY518a/IC17L-k0, IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0, IC17HdK-MY201/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0, IC17HdK-MY518/IC17L-k0, hoặc IC17HdK-TT16/IC17L-k0) đối với cả lượng IL-2 và IFN- γ trong chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy ở điều kiện không có ATP nhỏ hơn số lần thay đổi liên quan đến kháng thể đối chứng âm ở các điều kiện khi có mặt 250 μ M ATP được đánh giá là có hoạt tính chủ vận CD137 thấp hơn ở điều kiện không có ATP. Các kháng thể được đánh giá là có hoạt tính chủ vận CD137 thấp hơn khi không có ATP được thể hiện trong Bảng 25 (Fig. 16,

Fig. 17, Fig. 18, Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22, và Fig. 23). Các kháng thể này được cho thấy là bộc lộ hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP.

Bảng 25

Tên kháng thể được đánh giá	Tên kháng thể được đánh giá là có hoạt tính khi có mặt ATP	Tên kháng thể được đánh giá là có hoạt tính thấp khi không có ATP
A375-MY518/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-MY201aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-MY518/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-MY518a/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	
A551-SCF060a/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib	
A551-SCF056a/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib	
A551-SCF057a/B379-LamLib		
A551-SCF059a/B379-LamLib		
A551-SCF056aPh/B379-LamLib		
A551-SCF057aPh/B379-LamLib		
A551-SCF059aPh/B379-LamLib		
A375-TT16/B167-LamLib		
A356-TT16/B040-LamLib		
A551-TT16/B379-LamLib		

Ví dụ 6: Thử nghiệm sử dụng các kháng thể chuyển kháng CD137 của người cho chuột knock-in CD137 của người

(6-1) Tạo ra các kháng thể cho nghiên cứu sử dụng chuột knock-in CD137 của người

Kháng thể chuyển và không chuyển kháng CD137 của người có vùng hằng định của chuột được tạo ra cho nghiên cứu sử dụng chuột knock-in CD137 của người. Cụ thể là, kháng thể không chuyển kháng CD137 của người (20H4.9-mIgG1/20H4.9LC-mk0 viết tắt là: NS1-mIgG1, 20H4.9-MB110/20H4.9LC-mk0 viết tắt là: NS1-MB110, 20H4.9-MB492/20H4.9LC-mk0 viết tắt là: NS1-MB492, MOR-7480.1 H-MB110/MOR-7480.1 L-ml0r viết tắt là: NS2-MB110, MOR-7480.1 H-MB492/MOR-7480.1 L-ml0r viết tắt là: NS2-MB492), và các kháng thể chuyển kháng CD137 của người (A375-mIgG1/B167-ml0r, A372-mIgG1/B040-ml0r, A372-MB110/B040-ml0r, A372-MB492/B040-ml0r, A356-MB110/B040-ml0r, A486-MB492/B167-ml0r, A488-MB492/B226-ml0r, A489-MB492/B223-ml0r, A551-mIgG1/B256-ml0r, A551-MB110/B379-ml0r, và A548-mIgG1/B256-ml0r) được tạo ra.

Đối với các chuỗi nặng của các kháng thể NS1-mIgG1, NS1-MB110 và NS1-MB492, các gen của chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra bằng cách kết hợp vùng biến đổi chuỗi nặng 20H4.9 (SEQ ID NO: 139) với bất kỳ trong số:

- (i) mIgG1, vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của chuột (SEQ ID NO: 144),
- (ii) MB110 như được mô tả trong WO2014030750 (SEQ ID NO: 145), và
- (iii) MB492 như được mô tả trong WO2014030750 (SEQ ID NO: 146),

là vùng hằng định chuỗi nặng. Nghĩa là, các gen của 20H4.9-mIgG1, 20H4.9-MB110, và 20H4.9-MB492 được tạo ra.

Đối với chuỗi nhẹ của các kháng thể NS1-mIgG1, NS1-MB110, và NS1-MB492, gen chuỗi nhẹ của kháng thể 20H4.9LC-mk0 được tạo ra bằng cách kết hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ 20H4.9LC (SEQ ID NO: 140) với chuỗi κ mk0 của chuột (SEQ ID NO: 147) là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Bằng cách kết hợp các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này, mỗi kháng thể được biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Đối với các chuỗi nặng của các kháng thể NS2-MB110 và NS2-MB492, các gen của chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra bằng cách kết hợp vùng biến đổi chuỗi nặng MOR-7480 (SEQ ID NO: 142) với:

(i) MB110 (SEQ ID NO: 145), hoặc

(ii) MB492 (SEQ ID NO: 146),

là vùng hằng định chuỗi nặng. Nghĩa là, các gen MOR-7480.1H-MB110 và MOR-7480.1H-MB492 được tạo ra.

Đối với các chuỗi nhẹ của các kháng thể NS2-MB110 và NS2-MB492, gen chuỗi nhẹ của kháng thể MOR-7480.1L-ml0r được tạo ra bằng cách kết hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ MOR-7480.1L (SEQ ID NO: 143) với chuỗi λ ml0r của chuột (SEQ ID NO: 148) là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Bằng cách kết hợp các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này, mỗi kháng thể được biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Đối với các kháng thể chuyển kháng CD137, các gen của chuỗi nặng của kháng thể và chuỗi nhẹ của kháng thể trong các bảng 26 và 27 dưới đây được tạo ra; và mỗi kháng thể được biểu hiện và tinh chế bằng cách kết hợp các gen này bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Chuỗi nặng của kháng thể của các kháng thể chuyển kháng CD137 có vùng hằng định của chuột

Bảng 26

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A375-mIgG1	Vùng biến đổi	A375 (SEQ ID NO: 43)
		Vùng hằng định	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A372-mIgG1	Vùng biến đổi	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Vùng hằng định	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A372-MB110	Vùng biến đổi	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Vùng hằng định	MB110 (SEQ ID NO: 145)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A372-MB492	Vùng biến đổi	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Vùng hằng định	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A356-MB110	Vùng biến đổi	A356 (SEQ ID NO: 45)

		Vùng hằng định	MB110 (SEQ ID NO: 145)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A486-MB492	Vùng biến đổi	A486 (SEQ ID NO: 46)
		Vùng hằng định	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A488-MB492	Vùng biến đổi	A488 (SEQ ID NO: 48)
		Vùng hằng định	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A489-MB492	Vùng biến đổi	A489 (SEQ ID NO: 49)
		Vùng hằng định	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A548-mIgG1	Vùng biến đổi	A548 (SEQ ID NO: 50)
		Vùng hằng định	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A551-mIgG1	Vùng biến đổi	A551 (SEQ ID NO: 51)
		Vùng hằng định	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	A551-MB110	Vùng biến đổi	A551 (SEQ ID NO: 51)
		Vùng hằng định	MB110 (SEQ ID NO: 145)

Chuỗi nhẹ của kháng thể của các kháng thể chuyển kháng CD137 có vùng hằng định của chuột

Bảng 27

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	B040-ml0r	Vùng biến đổi	B040 (SEQ ID NO: 55)
		Vùng hằng định	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	B167-ml0r	Vùng biến đổi	B167 (SEQ ID NO: 54)
		Vùng hằng định	ml0r (SEQ ID NO: 148)

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	B226-ml0r	Vùng biến đổi	B226 (SEQ ID NO: 56)
		Vùng hằng định	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	B223-ml0r	Vùng biến đổi	B223 (SEQ ID NO: 57)
		Vùng hằng định	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	B256-ml0r	Vùng biến đổi	B256 (SEQ ID NO: 59)
		Vùng hằng định	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	B379-ml0r	Vùng biến đổi	B379 (SEQ ID NO: 60)
		Vùng hằng định	ml0r (SEQ ID NO: 148)

(6-2) Đánh giá hoạt tính liên kết với CD137 của người của các kháng thể được điều chế cho nghiên cứu sử dụng chuột knock-in CD137 của người

Hoạt tính liên kết của kháng thể không chuyển kháng CD137 của người và kháng thể chuyển kháng CD137 được tạo ra trong Ví dụ 6-1 đối với CD137 của người được đánh giá. Các phép đo khả năng liên kết với CD137 của người được thực hiện ở 37°C sử dụng 20 mM ACES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, và 0,05% Tween20 làm hệ đệm chạy. Đầu tiên, các kháng thể bị bắt giữ bằng cách tương tác các dung dịch kháng thể được điều chế trong hệ đệm chạy với chip cảm biến Series S CM5 (GE Healthcare) được cố định bằng kháng thể kháng IgG của chuột ở thỏ (Thermo Scientific). Hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt ATP và khi không có ATP sau đó được đánh giá bằng tương tác với dung dịch CD137 của người được điều chế trong hệ đệm chạy được bổ sung nồng độ của ATP mong muốn, hoặc dung dịch CD137 của người được điều chế trong hệ đệm chạy mà không có ATP. Đối với kháng nguyên CD137 của người, hCD137 (FXa được tiêu hóa) được điều chế trong Ví dụ (1-2) được sử dụng, và các phép đo được thực hiện ở nồng độ kháng nguyên là 0, 15,625, 62,5, 250, và 1000 nM. Chip này được tái tạo bằng cách sử dụng 25 mM NaOH và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5), và phép đo được thực hiện bằng cách bắt giữ lặp đi lặp lại các kháng thể. Hằng số phân ly

(KD) của các kháng thể tương ứng đối với CD137 của người được tính toán bằng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Cụ thể là, hằng số tốc độ liên kết k_a (L/mol/giây) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/giây) được tính toán bằng phương pháp vẽ theo điểm toàn bộ biểu đồ thu được bằng phép đo sử dụng mẫu liên kết Langmuir 1:1, và hằng số phân ly KD (mol/L) được tính toán từ các giá trị này.

Bảng 28 thể hiện các kết quả của các phép đo này.

Phân tích khả năng liên kết với CD137 của người của các kháng thể kháng CD137 có vùng hằng định của chuột

Bảng 28

Tên kháng thể	K_D (M) đối với CD137 của người			
	Không có ATP	ATP=1 μ M	ATP=10 μ M	ATP=100 μ M
NS1-mIgG1	6,17E-08	5,62E-08	5,44E-08	5,36E-08
NS1-MB110	6,10E-08	5,65E-08	5,39E-08	5,19E-08
NS1-MB492	6,16E-08	5,49E-08	5,35E-08	5,04E-08
NS2-MB110	1,88E-07	1,44E-07	1,02E-07	1,04E-07
NS2-MB492	2,16E-07	1,70E-07	1,12E-07	1,12E-07
A375-mIgG1/ B167-ml0r	N.A.	3,43E-07	1,14E-07	2,92E-08
A372-mIgG1/ B040-ml0r	N.A.	4,78E-07	2,59E-07	1,08E-07
A372-MB110/ B040-ml0r	N.A.	6,11E-07	2,64E-07	1,12E-07
A372-MB492/ B040-ml0r	N.A.	7,82E-07	2,51E-07	1,04E-07
A356-MB110/ B040-ml0r	N.A.	1,01E-06	4,10E-07	1,68E-07
A486-MB492/ B167-ml0r	N.A.	1,31E-07	2,70E-08	7,67E-09
A488-MB492/ B226-ml0r	N.A.	N.D.	1,36E-07	8,25E-08
A489-MB492/ B223-ml0r	N.A.	1,62E-06	3,58E-07	1,54E-07
A551-mIgG1/	N.A.	7,55E-07	2,31E-07	6,22E-08

B256-ml0r				
A551-MB110/ B379-ml0r	N.A.	5,12E-07	1,43E-07	3,51E-08
A548-mIgG1/ B256-ml0r	N.A.	8,61E-07	2,19E-07	5,58E-08

N.A. : Quá yếu để xác định giá trị KD.

N.D. : Không xác định

Cả kháng thể không chuyển kháng CD137 của người và kháng thể chuyển kháng CD137 của người được tạo ra ở trên, mà bao gồm vùng hằng định của chuột, được xác nhận là liên kết với CD137 của người. Tất cả các kháng thể chuyển kháng CD137 của người cũng được thể hiện là liên kết với CD137 của người theo cách phụ thuộc nồng độ ATP. Mặt khác, đối với kháng thể không chuyển, không quan sát thấy khả năng liên kết với CD137 của người phụ thuộc nồng độ ATP, và khả năng liên kết gần như giống nhau ở nồng độ ATP bất kỳ.

(6-3) Đánh giá động học trong huyết tương của các kháng thể được cải biến ở chuột knock-in CD137 của người

(6 6-1) Tạo ra chuột knock-in CD137 của người

Bằng cách đưa vector thay thế gen CD137 của người vào tế bào gốc phôi của chuột (các tế bào ES), chuột knock-in CD137 của người được tạo ra trong đó gen CD137 của chuột được thay thế bằng gen CD137 của người. Chuột này được mô tả là chuột hCD137 KI.

(6-3-2) Phép đo nồng độ kháng thể kháng CD137 của người trong huyết tương ở mô hình chuột hCD137KI

Sau khi tạo ra chuột hCD137KI trong Ví dụ 6-3-1, các kháng thể tương ứng được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều đơn cho chuột hCD137KI như được thể hiện trong Bảng 29. Trong Bảng 29, NS1-mIgG1, NS1-MB110 và NS1-MB492 là toàn bộ kháng thể không chuyển, và còn lại là kháng thể chuyển. Máu được thu thập nhiều lần theo thời gian từ 5 phút đến 28 ngày sau khi sử dụng. Máu thu được được ly tâm để tách huyết tương. Huyết tương được bảo quản trong buồng đông lạnh cài đặt nhiệt độ dưới -20°C đến khi đo.

Chi tiết nhóm cho nghiên cứu đánh giá động học huyết tương

Bảng 29

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]
1	3	NS1-mIgG1	sử dụng liều đơn 7,5
2	3	NS1-MB110	sử dụng liều đơn 7,5
3	3	NS1-MB492	sử dụng liều đơn 7,5
4	3	A375-mIgG1/B167-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
5	3	A356-MB110/B040-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
6	3	A372-mIgG1/B040-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
7	3	A372-MB110/B040-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
8	3	A372-MB492/B040-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
9	3	A486-MB492/B167-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
10	3	A488-MB492/B226-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
11	3	A489-MB492/B223-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
12	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
13	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5
14	3	A551-MB110/B379-ml0r	sử dụng liều đơn 7,5

Nồng độ của mỗi kháng thể chuyển trong huyết tương được đo bằng phương pháp điện hóa phát quang (ECL). Cụ thể là, hCD137 (Sino Biological Inc.) được pha loãng trong PBS (-) và bổ sung vào đĩa 96 giếng MULTI-ARRAY (Meso Scale Diagnostics, LLC). hCD137 được bổ sung vào đĩa và lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, và hCD137 được giữ cố định trên đĩa. Tiếp theo, để phong bế, dung dịch PBS chứa 1% BSA và 0,05% Tween 20 được bổ sung, và lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ. Đường chuẩn cho các kháng thể chuyển riêng biệt được điều chế ở các nồng độ huyết tương là 64, 32, 16, 8, 4, 2, và 1 ng/mL. Sau khi bổ sung dung dịch PBS chứa 3 mM ADP, 1% BSA, và 0,05% Tween 20 vào đĩa được cố định hCD137, hai lần thể tích của mẫu huyết tương được pha loãng trong dung dịch PBS chứa 1% BSA và 0,05% Tween20, cũng như mẫu đường cong chuẩn được bổ sung vào đó. Sau khi đĩa được lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, kháng thể kháng IgG của chuột được biotin hóa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được bổ sung. Ngoài ra, sau khi đĩa được lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, SULFO-TAG Labeled Streptavidin (Meso Scale Diagnostics, LLCs) được bổ sung. Ngoài ra, sau khi đĩa được lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, hệ đệm đọc T (Meso Scale

Diagnostics, LLCs) được pha loãng hai lần bằng dung dịch PBS chứa 2 mM ADP, 1% BSA, và 0,05% Tween 20 được bổ sung. Phép đo nồng độ kháng thể ở huyết tương của chuột hCD137KI được thực hiện bằng cách phát hiện sử dụng SULFO-TAG trên SECTOR Imager (Meso Scale Diagnostics, LLC). Việc tính toán các nồng độ kháng thể riêng trong huyết tương của chuột được thực hiện bằng cách sử dụng SOFTmax PRO (Molecular Devices).

Nồng độ của các kháng thể không chuyển trong huyết tương được đo bằng phương pháp điện hóa phát quang (ECL). Cụ thể là, hCD137 (Sino Biological Inc.) được pha loãng trong PBS(-) và được thêm vào đĩa 96 giếng MULTI-ARRAY (Meso Scale Diagnostics, LLC). hCD137 được bổ sung vào đĩa và lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, và hCD137 được giữ cố định trên đĩa. Tiếp theo, để phong bế, dung dịch PBS chứa 1% BSA và 0,05% Tween 20 được bổ sung, và lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ. Đường chuẩn cho các kháng thể không chuyển riêng được điều chế ở các nồng độ huyết tương là 32, 16, 8, 4, 2, 1, và 0,5 ng/mL. Các mẫu huyết tương được pha loãng trong dung dịch PBS chứa 1% BSA, 0,05% Tween20 cũng như mẫu đường cong chuẩn được bổ sung vào đĩa được giữ cố định bằng hCD137. Sau khi đĩa được lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, kháng thể kháng IgG của chuột được biotin hóa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được bổ sung. Ngoài ra, sau khi đĩa được lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, SULFO-TAG Labeled Streptavidin (Meso Scale Diagnostics, LLCs) được bổ sung. Ngoài ra, sau khi đĩa được lắc ở nhiệt độ phòng trong một giờ, hệ đệm đọc T (Meso Scale Diagnostics, LLCs) được pha loãng hai lần được bổ sung. Phép đo nồng độ kháng thể trong huyết tương của chuột hCD137KI được thực hiện tương tự với phép đo nồng độ kháng thể chuyển được mô tả ở trên.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 24, 25 và 26.

Fig. 24 thể hiện khoảng thời gian nồng độ huyết tương trung bình ở chuột hCD137 KI của các kháng thể có mIgG1 là Fc (NS1-mIgG1 là kháng thể không chuyển, và A375-mIgG1/B167-ml0r, A372-mIgG1/B040-ml0r, A548-mIgG1/B256-ml0r hoặc A551-mIgG1/B256-ml0r là kháng thể chuyển) trong số các kháng thể được thể hiện trong Bảng 29. Fig. 25 thể hiện khoảng thời gian của các nồng độ huyết tương trung bình ở chuột hCD137 KI của các kháng thể có MB110 là Fc (NS1-MB110 là kháng thể không chuyển, và A356-MB110/B040-ml0r, A372-MB110/B040-ml0r, và A551-MB110/B379-ml0r là các kháng thể chuyển). Fig. 26

thể hiện khoảng thời gian của nồng độ trong huyết tương trung bình ở chuột CD137 KI của các kháng thể có MB492 là Fc (NS1-MB492 là kháng thể không chuyển, và A372-MB492/B040-ml0r, A486-MB492/B167-ml0r, A488-MB492/B226-ml0r, hoặc A489-MB492/B223-ml0r là kháng thể chuyển). Trên Fig. 26, đối với A488-MB492/B226-ml0r, sự sụt giảm mạnh về thời gian nồng độ trong huyết tương nghi ngờ là do ADA đã được xác nhận ở một đối tượng, và giá trị trung bình thu được từ hai đối tượng.

Ở chuột hCD137 KI, bằng Fc bất kỳ, kháng thể chuyển thể hiện sự thải trừ khỏi huyết tương chậm hơn kháng thể không chuyển. Điều này được cho là do so với kháng thể chuyển, kháng thể không chuyển liên kết với CD137 được biểu hiện trong cơ thể và thải trừ khỏi huyết tương nhanh hơn. Hơn nữa, được cho rằng nồng độ ATP ngoại bào trong mô bình thường đủ thấp đến mức các kháng thể chuyển được sử dụng trong nghiên cứu này không liên kết với CD137 của người. Những kết quả này cho thấy rằng khả năng liên kết với kháng nguyên được biểu hiện một cách hệ thống có thể được giảm bằng cách sử dụng các kháng thể chuyển, và do đó có thể điều chế kháng thể có động học máu tăng cường.

(6-4) Sự di chuyển hiệu quả của thuốc và các dấu hiệu đáp ứng toàn thân của kháng thể kháng CD137 bằng mô hình cấy ghép tế bào khối u tổng hợp sử dụng chuột hCD137KI

(6-4-1) Tạo ra các dòng tế bào và mô hình chuột cấy ghép khối u tổng hợp, cũng như phương pháp đánh giá tác dụng kháng u và đáp ứng toàn thân

Các tế bào của dòng tế bào ung thư đại trực tràng ở chuột MC38 được cấp phép từ Viện Ung thư Quốc gia và chuột hCD137 KI được mô tả trong Ví dụ 6-3-1 được sử dụng cho nhiều nghiên cứu khác nhau. Mô hình được tạo thành khi thể tích khối u đạt xấp xỉ 50-300 mm³ bằng cách cấy dòng tế bào MC38 dưới da trong bụng chuột. Sau khi thành lập mô hình, chuột được cấy dòng tế bào MC38 được nhóm lại và sau đó các kháng thể kháng CD137 khác nhau được sử dụng.

Để đánh giá tác dụng kháng u, phép đo thể tích khối u được thực hiện với tần suất 1-2 lần một tuần. Thể tích khối u được tính toán theo công thức dưới đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{chiều dài (mm)} \times \text{chiều rộng (mm)} \times \text{chiều rộng (mm)} / 2$$

Bằng cách loại bỏ gan và lá lách hoặc hạch bạch huyết ở thời điểm thích hợp sau khi sử dụng kháng thể, các đáp ứng toàn thân được đánh giá bởi khối lượng cơ quan, số lượng tế bào của phần lympho bào, hoặc phân tích tế bào T bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng (FCM). Trong quá trình đánh giá các chỉ số này, kháng thể chuyển được đánh giá là đã ngăn chặn các đáp ứng toàn thân và/hoặc sự hoạt hóa tế bào T ở mô không phải khối u (ví dụ, hạch bạch huyết, lá lách, và gan) khi chỉ số đáp ứng toàn thân là thấp so với cùng lượng kháng thể không chuyển (kháng thể kháng CD137 của người đối chứng không có hoạt tính liên kết với CD137 phụ thuộc ATP).

Các kháng thể được tạo ra trong Ví dụ 6-1 (sự sản sinh các kháng thể cho thử nghiệm sử dụng chuột knock-in CD137 của người) được sử dụng trong các thử nghiệm khác nhau.

(6-4-2) Thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào

Thực hiện đo khối lượng của lá lách và hạch bạch huyết thu được, và đếm tế bào của các phần lympho bào. Các phần lympho bào thu được bằng cách sử dụng bộ kit phân ly gan, chuột (Milteny Biotec) cũng được sử dụng để đánh giá sự hoạt hóa của gan. Các phần lympho bào sau khi ly giải hồng cầu được sử dụng để đánh giá sự hoạt hóa trong lá lách, và phần lympho bào thu được bằng cách nghiền được sử dụng để đánh giá sự hoạt hóa trong hạch bạch huyết.

(6-4-3) Phân tích FCM sử dụng phần lympho bào từ các cơ quan khác nhau

Để đánh giá các chất đánh dấu hoạt hóa bằng FCM, sự biểu hiện Granzym B hoặc PD-1 hoặc sự biểu hiện ICOS trên các tế bào T dương tính với CD8 α hoặc tỷ lệ phần trăm của các tế bào T dương tính với CD8 α ở các tế bào dương tính với CD45 được sử dụng. Vì lý do này, kháng thể kháng Granzym B được đánh dấu huỳnh quang, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng ICOS, kháng thể kháng CD8 α và kháng thể kháng CD45 được sử dụng trong phân tích FCM. Các phép đo được thực hiện bằng BD LSRIIFortessa™ X-20 (BD Biosciences).

(6-4-4) Các nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A375-mIgG1/B167-mI0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng và A375-mIgG1/B167-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 30. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của A375-mIgG1/B167-ml0r

Bảng 30

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm
2	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	22,5	Vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm
3	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm
4	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	2,5	Vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm
5	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	0,83	Vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm
6	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	0,28	Vào ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Kết quả là, tác dụng kháng u phụ thuộc liều của kháng thể A375-mIgG1/B167-ml0r được xác nhận (Fig. 27).

(6-4-5) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của A375-mIgG1/B167-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, NS1-mIgG1 (kháng thể không chuyển) và A375-mIgG1/B167-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 31. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Năm ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập như được thể hiện trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Hơn nữa, đối với lá lách và hạch bạch huyết, các cơ quan từ ba con chuột được gộp lại, và phân tích FCM được thực hiện như được thể hiện trong Ví dụ 6-4-3 (phân tích FCM sử dụng phần lympho bào từ các cơ quan khác nhau).

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với kháng thể A375-mIgG1/B167-ml0r

Bảng 31

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
2	3	NS1-mIgG1	0,06	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
3	3	NS1-mIgG1	0,3	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
4	3	NS1-mIgG1	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
5	3	NS1-mIgG1	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
6	3	NS1-mIgG1	37,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
7	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
8	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
9	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	37,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm

Đánh giá các tác dụng toàn thân bằng các kháng thể được sử dụng. Theo kết quả đánh giá khối lượng cơ quan của hạch bạch huyết và lách, sự gia tăng khối lượng cơ quan đã được quan sát thấy khi NS1-mIgG1 được sử dụng ở 0,3 mg/kg, và sự phì đại cơ quan dữ dội hơn được quan sát thấy ở 1,5 mg/kg và 7,5 mg/kg. Mặt khác, không quan sát thấy sự phát triển của cơ quan ở liều bất kỳ trong số 1,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, hoặc 37,5 mg/kg khi sử dụng A375-mIgG1/B167-ml0r (Fig. 28).

Ngoài ra, theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa tế bào T bằng đánh giá FCM, sự gia tăng biểu hiện của tất cả các chất đánh dấu PD-1, ICOS và Granzyme B đã được quan sát thấy ở 0,3 mg/kg sau khi dùng NS1-mIgG1. Mặt khác, khi sử dụng A375-mIgG1/B167-ml0r, có chất ức chế sự biểu hiện một cách đáng kể của tất cả các chất đánh dấu PD-1, ICOS và Granzyme B ở các liều 1,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, và 37,5 mg/kg (Fig. 29 và Fig. 30). Vì kết quả A375-mIgG1/B167-ml0r cho thấy khối lượng cơ quan có tương quan với các chất đánh dấu hoạt hóa tế bào T trong hạch bạch huyết và lá lách, khối lượng cơ quan được sử dụng chủ yếu làm chỉ số hoạt hóa tế bào miễn dịch có nguồn gốc từ hạch bạch huyết và lá lách trong quá trình đánh giá các kháng thể tiếp theo.

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa của các tế bào T trong gan, việc gia tăng biểu hiện của PD-1 và Granzyme B đã được quan sát thấy khi sử dụng NS1-mIgG1 ở liều 0,3 mg/kg. Mặt khác, khi sử dụng A375-mIgG1/B167-ml0r, các biểu hiện bị ức chế ở tất cả các liều 1,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, và 37,5 mg/kg (Fig. 31).

Do đó, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết, lá lách, và gan so với cùng một lượng kháng thể không chuyển.

(6-4-6) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A356-MB110/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng và A356-MB110/B040-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 32. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của A356-MB110/B040-ml0r

Bảng 32

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
2	5	A356-MB110/B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
3	5	A356-MB110/B040-ml0r	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Các kết quả này xác nhận tác dụng kháng u phụ thuộc liều của A356-MB110/B040-ml0r (Fig. 32).

(6-4-7) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của A356-MB110/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá dược lỏng, NS2-MB110 (kháng thể không chuyển) và A356-MB110/B040-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 33. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá dược lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Bảy ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập theo cách nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Đối với lá lách và hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đo khối lượng cơ quan.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với kháng thể A356-MB110/B040-ml0r

Bảng 33

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và	Bảy ngày

				ba ngày sau khi phân nhóm	sau khi phân nhóm
2	3	NS2-MB110	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
3	3	NS2-MB110	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
4	3	NS2-MB110	0,3	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
5	3	A356-MB110/ B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
6	3	A356-MB110/ B040-ml0r	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm

Đánh giá các tác dụng toàn thân của các kháng thể được sử dụng. Kết quả đánh giá khối lượng cơ quan của hạch bạch huyết và lá lách khi sử dụng NS2-MB110 và A356-MB110/B040-ml0r đã chứng minh rằng sự phì đại cũng được quan sát thấy khi sử dụng NS2-MB110 ở liều 2,5 mg/kg. Mặt khác, tại thời điểm sử dụng A356-MB110/B040-ml0r, bệnh sung hạch bạch huyết bị ức chế ngay ở liều 7,5 mg/kg, và phì đại lách bị ức chế ở liều 2,5 mg/kg (Fig. 33).

Ngoài ra, kết quả đánh giá sự hoạt hóa tế bào T trong gan đã cho thấy sự gia tăng biểu hiện PD-1 trong các tế bào dương tính với CD8 α cũng được quan sát thấy khi sử dụng NS2-MB110 ở liều 0,3 mg/kg. Trong khi đó, khi sử dụng A356-MB110/B040-ml0r, biểu hiện PD-1 bị ức chế ở liều 7,5 mg/kg, và bị ức chế đáng kể ở liều 2,5 mg/kg. Biểu hiện ICOS gia tăng nhẹ ở các tế bào dương tính với CD8 α cũng được quan sát thấy khi sử dụng kháng thể NS2-MB110 ở liều 0,3 mg/kg. Mặt khác, cũng quan sát thấy biểu hiện của tá dược lỏng bị ức chế ở liều 2,5 mg/kg khi sử dụng A356-MB110/B040-ml0r (Fig. 34).

Do đó, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết, lá lách, và gan so với kháng thể không chuyển.

(6-4-8) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A372-mIgG1/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng và A372-mIgG1/B040-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 34. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện bốn lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và 4 ngày, 7 ngày và 10 ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của A372-mIgG1/B040-ml0r

Bảng 34

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm, và bốn, bảy, và mười ngày sau khi phân nhóm
2	5	A372-mIgG1/B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm, và bốn, bảy, và mười ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Kết quả là, quan sát thấy tác dụng kháng u của kháng thể A372-mIgG1/B040-ml0r ở liều sử dụng 7,5 mg/kg (Fig. 35).

(6-4-9) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của A372-mIgG1/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng và A372-mIgG1/B040-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 35. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện ba lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm, và 3 ngày và 6 ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Bảy ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập theo cách nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được

cây dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Đối với lá lách, chỉ tiến hành đo khối lượng cơ quan; và đối với hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đếm tế bào của các phần lympho bào thu được từ lympho bào được gộp lại từ ba con chuột.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với kháng thể A372-mIgG1/B040-ml0r

Bảng 35

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm, và ba và sáu ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
2	3	A372-mIgG1/B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm, và ba và sáu ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm

Đánh giá các tác dụng toàn thân của các kháng thể được sử dụng. Theo kết quả đo số lượng tế bào trong các hạch bạch huyết và đánh giá khối lượng cơ quan trong các lá lách, đã xác nhận được rằng không có sự gia tăng số lượng tế bào trong các hạch bạch huyết và sự gia tăng khối lượng lá lách trong thời gian sử dụng A372-mIgG1/B040-ml0r và khối lượng cơ quan tương đương với khối lượng cơ quan trong nhóm tá dược lỏng (Fig. 36).

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa tế bào T trong gan, mức độ biểu hiện Granzym B tương tự với mức độ biểu hiện trong nhóm tá dược lỏng khi sử dụng A372-mIgG1/B040-ml0r (Fig. 37).

Do đó, đã xác nhận được rằng kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết, lá lách, và gan.

(6-4-10) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A372-MB110/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cây ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá dược lỏng và A372-MB110/B040-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 36. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào

ngày phân nhóm và bốn ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của A372-MB110/B040-ml0r

Bảng 36

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
2	5	A372-MB110/B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Kết quả là, tác dụng kháng u của A372-MB110/B040-ml0r được xác nhận (Fig. 38).

(6-4-11) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của A372-MB110/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, NS2-MB110 (kháng thể không chuyển) và A372-MB110/B040-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 37. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Bảy ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập như nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Đối với lá lách và hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đo khối lượng cơ quan.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với kháng thể A372-MB110/B040-ml0r

Bảng 37

Nhóm	Số động	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
------	---------	-----------	--------------	--------------	--------------

	vật				
1	3	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
2	3	NS2-MB110	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
3	3	NS2-MB110	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
4	3	NS2-MB110	0,3	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
5	3	A372-MB110/ B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
6	3	A372-MB110/ B040-ml0r	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm

Đánh giá các tác dụng toàn thân của các kháng thể được sử dụng. Theo kết quả đánh giá khối lượng cơ quan của hạch bạch huyết và lá lách, sự gia tăng khối lượng cơ quan quan sát được khi sử dụng NS2-MB110 ở liều 2,5 mg/kg và 7,5 mg/kg. Mặt khác, việc ức chế sự mở rộng bất thường của các cơ quan quan sát được ở cả hai liều 2,5 mg/kg và 7,5 mg/kg khi sử dụng A372-MB110/B040-ml0r (Fig. 39).

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa của các tế bào T trong gan, sự gia tăng biểu hiện của PD-1 quan sát được khi sử dụng NS2-MB110. Điều này cũng được thấy khi sử dụng A372-MB110/B040-ml0r (Fig. 40).

Do đó, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết và lá lách so với kháng thể không chuyển.

(6-4-12) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A372-MB492/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá dược lỏng và A372-MB492/B040-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng

38. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá dược lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của A372-MB492/B040-ml0r

Bảng 38

Nhóm	Số động vật	Dược phẩm	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
2	5	A372-MB492/ B040-ml0r	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
3	5	A372-MB492/ B040-ml0r	3,0	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
4	5	A372-MB492/ B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Kết quả là, tác dụng kháng u của kháng thể A372-MB492/B040-ml0r quan sát được ở tất cả các liều (Fig. 41).

(6-4-13) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của kháng thể A372-MB492/B040-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá dược lỏng, NS1-MB492 (kháng thể không chuyển) và A372-MB492/B040-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 39. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá dược lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Tám ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập theo cách nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Đối với lá lách, chỉ tiến hành đo khối lượng cơ quan; và đối với hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đếm tế bào của các phần lympho bào đã chuẩn bị.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân của kháng thể A372-MB492/B040-ml0r

Bảng 39

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Tám ngày sau khi phân nhóm
2	3	NS1-MB492	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Tám ngày sau khi phân nhóm
3	3	A372-MB492/B040-ml0r	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Tám ngày sau khi phân nhóm
4	3	A372-MB492/B040-ml0r	3,0	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Tám ngày sau khi phân nhóm
5	3	A372-MB492/B040-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Tám ngày sau khi phân nhóm

Đánh giá các tác dụng toàn thân của các kháng thể được sử dụng. Sự gia tăng khối lượng cơ quan từ khối lượng cơ quan của lá lách khi sử dụng NS1-MB492, và sự gia tăng các phần lympho bào từ phép đo số lượng tế bào khi sử dụng NS1-MB492 được quan sát. Mặt khác, khi sử dụng A372-MB492/B040-ml0r với liều 1,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, và 7,5 mg/kg, việc ức chế sự phì đại bất thường của các cơ quan được quan sát so với NS1-MB492 (Fig. 42).

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa của các tế bào T trong gan, sự gia tăng biểu hiện của Granzym B được quan sát khi sử dụng NS1-MB492 và A372-MB492/B040-ml0r được so sánh với tá dược lỏng (Fig. 43).

Đo đó, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết và lá lách so với kháng thể không chuyển.

(6-4-4) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên các kháng thể A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 40. Việc phân nhóm được thực hiện 10 ngày sau khi cấy ghép tế bào, và việc sử dụng kháng thể được thực hiện qua đường tĩnh mạch đuôi ở 11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép tế bào cho tổng cộng bốn lần. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của thuốc trên các kháng thể A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r

Bảng 40

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá được lỏng	-	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép
2	5	A486-MB492/B167-ml0r	7,5	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép
3	5	A488-MB492/B226-ml0r	7,5	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Các kết quả này đã xác nhận tác dụng kháng u của A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r (Fig. 44).

(6-4-15) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, NS1-MB492 (kháng thể không chuyển) và A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 41. Việc phân nhóm được thực hiện 10 ngày sau khi cấy ghép tế bào, và việc sử dụng kháng thể được

thực hiện qua đường tĩnh mạch đuôi ở 11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép tế bào tổng cộng bốn lần. Đối với tá dược lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập 13 ngày sau khi sử dụng lần đầu theo cách được nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Đối với lá lách, chỉ tiến hành đo khối lượng cơ quan; và đối với hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đếm tế bào của các phần lympho bào.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với các kháng thể A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r

Bảng 41

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Số ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá dược lỏng	-	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép	24 ngày sau khi cấy ghép (13 ngày sau khi sử dụng lần đầu)
2	3	NS1-MB492	7,5	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép	24 ngày sau khi cấy ghép (13 ngày sau khi sử dụng lần đầu)
3	3	A486-MB492/ B167-ml0r	7,5	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép	24 ngày sau khi cấy ghép (13 ngày sau khi sử dụng lần đầu)
4	3	A488-MB492/ B226-ml0r	7,5	11, 15, 18, và 22 ngày sau khi cấy ghép	24 ngày sau khi cấy ghép (13 ngày sau khi sử dụng lần đầu)

Theo kết quả của phép đo số lượng tế bào của các phần lympho bào đối với hạch bạch huyết và phép đo khối lượng lá lách, sự gia tăng số lượng tế bào lympho bào và khối lượng lá lách quan sát được khi sử dụng NS1-MB492. Mặt khác, quan sát được sự gia tăng số lượng lympho bào và khối lượng lá lách bị ức chế khi sử dụng A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r so với sự gia tăng số

lượng lympho bào và khối lượng lá lách bị ức chế khi sử dụng NS1-MB492 (Fig. 45).

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa của các tế bào T trong gan, sự gia tăng tỷ lệ phần trăm của các tế bào dương tính với CD8 α được quan sát khi sử dụng NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r và A488-MB492/B226-ml0r so với tá được lỏng (Fig. 46).

Từ những điều trên, được xác nhận là so với kháng thể không chuyển, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết và lá lách.

(6-4-16) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A489-MB492/B223-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng và A489-MB492/B223-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 42. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện bốn lần qua đường tĩnh mạch đuôi sau ngày phân nhóm và 4 ngày, 7 ngày, và 10 ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của thuốc trên A489-MB492/B223-ml0r

Bảng 42

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá được lỏng	-	Vào sau ngày phân nhóm, và bốn, bảy, và mười ngày sau khi phân nhóm
2	5	A489-MB492/B223-ml0r	7,5	Vào sau ngày phân nhóm, và bốn, bảy, và mười ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Kết quả là, tác dụng kháng u được xác nhận ở liều sử dụng 7,5 mg/kg (Fig. 47).

(6-4-17) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của kháng thể A489-MB492/B223-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, NS1-MB492 (kháng thể không chuyển) và A489-MB492/B223-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 43. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm, và 3 ngày và 6 ngày sau khi phân nhóm trong tổng cộng ba lần. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Bảy ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập theo cách nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào). Đối với lá lách và hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đo số lượng tế bào của phần lympho bào được chuẩn bị.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân của kháng thể A489-MB492/B223-ml0r

Bảng 43

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm, và ba và sáu ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
2	3	NS1-MB492	7,5	Vào ngày phân nhóm, và ba và sáu ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm
3	3	A489-MB492/ B223-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm, và ba và sáu ngày sau khi phân nhóm	Bảy ngày sau khi phân nhóm

Theo kết quả của phép đo số lượng tế bào của các phần lympho bào đối với hạch bạch huyết và lá lách, sự gia tăng số lượng tế bào quan sát được khi sử dụng NS1-MB492. Mặt khác, quan sát được việc ức chế sự gia tăng số lượng lympho bào khi sử dụng A489-MB492/B223-ml0r so với việc ức chế sự gia tăng số lượng lympho bào khi sử dụng NS1-MB492 (Fig. 48).

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa của các tế bào T trong gan, sự gia tăng tỷ lệ phần trăm của các tế bào dương tính với CD8 α được quan sát khi sử dụng NS1-MB492 và A489-MB492/B223-ml0r so với tá được lỏng (Fig. 49).

Từ những điều trên, được xác nhận là so với kháng thể không chuyển, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết và lá lách.

(6-4-18) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên các kháng thể A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 44. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của thuốc trên các kháng thể A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r

Bảng 44

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	5	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
2	5	A548-mIgG1/B256-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
3	5	A548-mIgG1/B256-ml0r	37,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
4	4	A548-mIgG1/B256-ml0r	100	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
5	5	A551-mIgG1/B256-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
6	5	A551-mIgG1/B256-ml0r	37,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
7	4	A551-mIgG1/B256-ml0r	100	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Các kết quả này thể hiện tác dụng kháng u bằng cách sử dụng A548-mIgG1/B256-ml0r ở liều 37,5 mg/kg và 100 mg/kg. A551-mIgG1/B256-ml0r cũng thể hiện tác dụng kháng u một cách đáng kể ở liều 100 mg/kg (Fig. 50).

(6-4-19) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân của các kháng thể A548-mIgG1/B256 và A551-mIgG1/B256

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, NS1-mIgG1 (kháng thể không chuyển) và A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 45. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Năm ngày sau khi sử dụng lần đầu, gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập theo cách nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phân lympho bào). Đối với lá lách và hạch bạch huyết, chỉ thực hiện đo khối lượng cơ quan.

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với các kháng thể A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r

Bảng 45

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
2	3	NS1-mIgG1	0,3	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
3	3	NS1-mIgG1	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
4	3	NS1-mIgG1	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
5	3	A548-mIgG1/	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau	Năm ngày sau khi phân

		B256-ml0r		khi phân nhóm	nhóm
6	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
7	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
8	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	100	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
9	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	1,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
10	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
11	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
12	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	100	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm

Theo kết quả đánh giá khối lượng cơ quan của hạch bạch huyết và lá lách, sự gia tăng khối lượng cơ quan quan sát được khi sử dụng NS1-mIgG1 ở liều 0,3 mg/kg, 1,5 mg/kg và 7,5 mg/kg. Mặt khác, không quan sát thấy chứng phì đại của các cơ quan khi sử dụng A548-mIgG1/B256-ml0r hoặc A551-mIgG1/B256-ml0r ở liều bất kỳ trong số 1,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 37,5 mg/kg, và 100 mg/kg (Fig. 51).

Theo kết quả đánh giá sự hoạt hóa của các tế bào T trong gan, sự gia tăng biểu hiện của cả Granzym B và PD-1 quan sát được khi sử dụng NS1-mIgG1 ở liều 0,3 mg/kg. Mặt khác, biểu hiện bị ức chế khi sử dụng A548-mIgG1/B256-ml0r và A551-mIgG1/B256-ml0r ở liều bất kỳ trong số 1,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 37,5 mg/kg, và 100 mg/kg (Fig. 52).

Do đó, so với kháng thể không chuyển, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết, lá lách, và gan.

(6-4-20) Nghiên cứu hiệu quả của thuốc (tác dụng kháng u) trên kháng thể A551-MB110/B379-ml0r

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng và A551-MB110/B379-ml0r được sử dụng với các liều lượng nêu trong Bảng 46. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Chi tiết nhóm để nghiên cứu hiệu quả của thuốc trên kháng thể A551-MB110/B379-ml0r

Bảng 46

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng
1	6	Tá được lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
3	6	A551-MB110/B379-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm
4	6	A551-MB110/B379-ml0r	22,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm

Tác dụng kháng u ở mỗi nhóm được đánh giá bằng thể tích khối u được tính như được mô tả trong Ví dụ 6-4-1. Kết quả là, tác dụng kháng u được xác nhận ở liều bất kỳ (Fig. 53).

(6-4-21) Sử dụng và lấy mẫu kháng thể cũng như phân tích FCM để đánh giá các tác dụng toàn thân

Sau khi thiết lập mô hình chuột cấy ghép MC38 trong Ví dụ 6-4-1, tá được lỏng, NS1-mIgG1 (kháng thể không chuyển) và A551-MB110/B379-ml0r được sử dụng như nêu trong Bảng 47. Việc sử dụng kháng thể được thực hiện hai lần qua đường tĩnh mạch đuôi vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm. Đối với tá được lỏng, PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng.

Gan, hạch bạch huyết, và lá lách được thu thập 5 ngày sau khi sử dụng lần đầu theo cách được nêu trong Ví dụ 6-4-2 (thu thập các cơ quan khác nhau từ chuột được cấy dòng tế bào MC38 và chuẩn bị các phần lympho bào), và phân tích FCM

được thực hiện theo cách được nêu trong Ví dụ 6-4-3 (phân tích FCM sử dụng phần lympho bào của các cơ quan khác nhau).

Chi tiết nhóm để đánh giá đáp ứng toàn thân với kháng thể A551-MB110/B379-ml0r

Bảng 47

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]	Ngày sử dụng	Ngày lấy mẫu
1	3	Tá dược lỏng	-	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
2	3	NS1-mIgG1	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
3	3	A551-MB110/B379-ml0r	0,83	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
4	3	A551-MB110/B379-ml0r	2,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
5	3	A551-MB110/B379-ml0r	7,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm
6	3	A551-MB110/B379-ml0r	22,5	Vào ngày phân nhóm và ba ngày sau khi phân nhóm	Năm ngày sau khi phân nhóm

Theo kết quả đánh giá khối lượng cơ quan của hạch bạch huyết và lá lách, sự gia tăng khối lượng cơ quan quan sát được khi sử dụng NS1-mIgG1 ở liều 7,5 mg/kg. Mặt khác, không quan sát thấy chứng phì đại của các cơ quan khi sử dụng A551-MB110/B379-ml0r ở liều bất kỳ trong số 0,83 mg/kg, 2,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, và 22,5 mg/kg (Fig. 54). Ngoài ra, khi đánh giá sự hoạt hóa tế bào T ở lá lách bằng cách đánh giá FCM, sự gia tăng các chất đánh dấu hoạt hóa (PD-1, ICOS, Granzym B) quan sát được khi sử dụng NS1-mIgG1 không được xác nhận khi sử dụng A551-MB110/B379-ml0r ở liều bất kỳ (Fig. 55).

Khi đánh giá sự hoạt hóa tế bào T trong gan, sự gia tăng biểu hiện của cả PD-1 và ICOS quan sát được khi sử dụng NS1-mIgG1 ở liều 7,5 mg/kg. Mặt khác,

sự ức chế biểu hiện đối với mức tá được lỏng khi sử dụng A551-MB110/B379-ml0r ở liều 0,83 mg/kg và 2,5 mg/kg, và biểu hiện này còn bị ức chế nhiều hơn biểu hiện của NS1-mIgG1 khi được sử dụng ở liều 7,5 mg/kg (Fig. 56).

Do đó, so với kháng thể không chuyển, kháng thể chuyển ức chế sự hoạt hóa của các tế bào T trong hạch bạch huyết, lá lách, và gan.

Ví dụ 7: Sự tạo thành Fc cải biến có khả năng tăng cường hoạt tính chủ vận

(7-1) Sự tạo thành các biến thể có hoạt tính liên kết với FcγR tăng

Vùng hằng định chuỗi nặng TT14 (SEQ ID NO: 149) mà làm tăng hoạt tính liên kết FcγRIIb như được mô tả trong WO2017104783 (vùng hằng định chuỗi nặng chứa T250V/T307P là các cải biến axit amin và L234Y/P238D/V264I/A330K là các cải biến axit amin để làm tăng hoạt tính liên kết với FcγRIIb trong vùng Fc chứa SEQ ID NO: 182 (các vị trí thay đổi đều được đánh số theo EU)), TT16 (SEQ ID NO: 150) chứa đột biến axit amin G237D được đưa vào vùng hằng định chuỗi nặng TT11 mà làm tăng hoạt tính liên kết với FcγRIIb như được mô tả trong WO2017104783 (vùng hằng định chuỗi nặng chứa cải biến axit amin của T250V/T307P và L234Y/P238D/A330K là các cải biến để làm tăng hoạt tính liên kết với FcγRIIb trong vùng Fc chứa SEQ ID NO: 182 (các vị trí thay đổi đều được đánh số theo EU)), vùng hằng định chuỗi nặng P587 (SEQ ID NO: 151) làm tăng hoạt tính liên kết với FcγRIIb như được mô tả trong WO2014163101; và P253 (SEQ ID NO: 93) là FcγRIIb có từ trước làm tăng khả năng liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, được kết hợp với vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuyển (A375; A372; A356; A486; A488; A489; A548; và A551) hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đối chứng âm (IC17HdK (SEQ ID NO: 152)). Các gen được tạo ra này kết hợp với mỗi vùng hằng định và vùng biến đổi chuỗi nặng như sau.

Bảng 48

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Vùng biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO)	Vùng hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO)
A375-TT14	A375 (SEQ ID NO: 43)	TT14 (SEQ ID NO: 149)
A375-TT16	A375 (SEQ ID NO: 43)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A375-P587	A375 (SEQ ID NO: 43)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A372-P253	A372 (SEQ ID NO: 44)	P253 (SEQ ID NO: 93)

A356-TT16	A356 (SEQ ID NO: 45)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A356-P587	A356 (SEQ ID NO: 45)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A486-P253	A486 (SEQ ID NO: 46)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A488-P253	A488 (SEQ ID NO: 48)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A489-P253	A489 (SEQ ID NO: 49)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A548-P587	A548 (SEQ ID NO: 50)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A551-TT16	A551 (SEQ ID NO: 51)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A551-P587	A551 (SEQ ID NO: 51)	P587 (SEQ ID NO: 151)
IC17HdK-TT16	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
IC17HdK-P587	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	P587 (SEQ ID NO: 151)
IC17HdK-P253	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	P253 (SEQ ID NO: 93)

Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuyển (A375, A356, và A551) hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đối chứng âm (IC17HdK (SEQ ID NO: 152)) được kết hợp với vùng hằng định chuỗi nặng MY201 (SEQ ID NO: 153) (vùng hằng định chuỗi nặng chứa G236N/H268D/A330K là các cải biến axit amin mà làm tăng hoạt tính liên kết với FcγRIIb trong vùng Fc chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 182 (các vị trí thay đổi đều được đánh số theo EU)) hoặc MY518 (SEQ ID NO: 154) (vùng hằng định chuỗi nặng chứa L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K là các cải biến axit amin mà làm tăng hoạt tính liên kết với FcγRIIb trong vùng Fc chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 182 (các vị trí thay đổi đều được đánh số theo EU), được mô tả trong WO 2017104783 và có hoạt tính liên kết với FcγR tăng, vùng hằng định chuỗi nặng MY201a (SEQ ID NO: 155) hoặc MY518a (SEQ ID NO: 156) trong đó cải biến K214R đã được đưa vào MY201 hoặc MY518, hoặc vùng hằng định chuỗi nặng MY201aPh (SEQ ID NO: 157) trong đó cải biến L235W đã được đưa vào MY201a. Các gen được tạo ra này kết hợp với mỗi vùng hằng định và vùng biến đổi chuỗi nặng như sau.

Bảng 49

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Vùng biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO)	Vùng hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO)
A375-MY201aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
A375-MY518	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A375-MY518a	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY518a (SEQ ID NO: 156)
A356-MY518	A356 (SEQ ID NO: 45)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A551-MY201a	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY201a SEQ ID NO: 155)
A551-MY201aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
A551-MY518	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A551-MY518a	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY518a (SEQ ID NO: 156)
IC17HdK-MY201	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY201 (SEQ ID NO: 153)
IC17HdK-MY201aPh	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
IC17HdK-MY518	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
IC17HdK-MY518a	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY518a (SEQ ID NO: 156)

Như được thể hiện trong Bảng 50, các kháng thể quan tâm được biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bằng cách kết hợp các gen chuỗi nặng của kháng thể nêu trên với gen chuỗi nhẹ của kháng thể của kháng thể chuyên (B040-Lamlib, B167-Lamlib, B226-Lamlib, B223-Lamlib, B256-Lamlib, và B379-Lamlib được tạo ra trong các ví dụ 5-2 và 5-3) hoặc gen chuỗi nhẹ của kháng thể của kháng thể đối chứng âm (IC17L-k0, được tạo ra bằng cách kết hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ IC17L (SEQ ID NO: 158) với chuỗi κ người k0 (SEQ ID NO: 141) dưới dạng vùng hằng định chuỗi nhẹ).

Các biến thể có hoạt tính liên kết với FcγR tăng

Bảng 50

Vùng biến đổi (chuỗi nặng / chuỗi nhẹ)	Vùng hằng định chuỗi nặng	Vùng hằng định chuỗi nhẹ	Tên kháng thể
A375 / B167	MY201aPh	Lamlib	A375-MY201aPh/B167-Lamlib
	MY518	Lamlib	A375-MY518/B167-Lamlib
	MY518a	Lamlib	A375-MY518a/B167-Lamlib
	P587	Lamlib	A375-P587/B167-Lamlib
	TT14	Lamlib	A375-TT14/B167-Lamlib
	TT16	Lamlib	A375-TT16/B167-Lamlib
A372 / B040	P253	Lamlib	A372-P253/B040-Lamlib
A356 / B040	MY518	Lamlib	A356-MY518/B040-Lamlib
	P587	Lamlib	A356-P587/B040-Lamlib
	TT16	Lamlib	A356-TT16/B040-Lamlib
A486 / B167	P253	Lamlib	A486-P253/B167-Lamlib
A488 / B226	P253	Lamlib	A488-P253/B226-Lamlib
A489 / B223	P253	Lamlib	A489-P253/B223-Lamlib
A548 / B256	P587	Lamlib	A548-P587/B256-Lamlib
A551 / B256	MY201a	Lamlib	A551-MY201a/B256-Lamlib
	MY201aPh	Lamlib	A551-MY201aPh/B256-Lamlib
	MY518	Lamlib	A551-MY518/B256-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B256-Lamlib
A551 / B379	MY518a	Lamlib	A551-MY518a/B379-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B379-Lamlib
	TT16	Lamlib	A551-TT16/B379-Lamlib
IC17HdK / IC17L	MY201	k0	IC17HdK-MY201/IC17L-k0
	MY201aPh	k0	IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
	MY518	k0	IC17HdK-MY518/IC17L-k0
	MY518a	k0	IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
	P253	k0	IC17HdK-P253/IC17L-k0
	P587	k0	IC17HdK-P587/IC17L-k0
	TT16	k0	IC17HdK-TT16/IC17L-k0

(7-2) Sự tạo thành các biến thể với pI tăng bằng cách cải biến axit amin của vùng hằng định

Vùng hằng định chuỗi nặng được tạo ra bằng cách kết hợp vùng hằng định chuỗi nặng có hoạt tính liên kết với FcγR tăng được tạo ra trong Ví dụ 7-1 với Q311R, P343R và D413K, là các đột biến axit amin làm tăng pI mà không làm thay đổi nhiều hoạt tính liên kết với FcγR như được mô tả trong WO2017046994.

Cụ thể là, các gen của vùng hằng định chuỗi nặng với các đột biến axit amin được đưa vào mỗi gen của vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra như được thể hiện dưới đây.

- Đưa P343R/D413K vào MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF025 (SEQ ID NO: 64)
- Đưa P343R/D413K vào MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF025a (SEQ ID NO: 65)
- Đưa P343R/D413K vào TT14 (SEQ ID NO: 149): SCF027 (SEQ ID NO: 66)
- Đưa P343R/D413K vào TT16 (SEQ ID NO: 150): SCF028 (SEQ ID NO: 67)
- Đưa Q311R/P343R vào MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF030 (SEQ ID NO: 68)
- Đưa Q311R/P343R vào TT14 (SEQ ID NO: 149): SCF032 (SEQ ID NO: 69)
- Đưa Q311R/P343R vào TT16 (SEQ ID NO: 150): SCF033 (SEQ ID NO: 70)
- Đưa P343R vào MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF039 (SEQ ID NO: 71)
- Đưa P343R vào MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF039a (SEQ ID NO: 72)
- Đưa D413K vào MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF040 (SEQ ID NO: 73)
- Đưa P343R vào MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF041a (SEQ ID NO: 74)
- Đưa P343R vào MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
- Đưa D413K vào MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF042a (SEQ ID NO: 76)
- Đưa P343R/D413K vào MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF043a (SEQ ID NO: 77)
- Đưa P343R/D413K vào MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
- Đưa Q311R vào MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF056a (SEQ ID NO: 79)
- Đưa Q311R vào MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
- Đưa Q311R/P343R vào MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF057a (SEQ ID NO: 81)
- Đưa Q311R/P343R vào MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)

- Đưa Q311R/D413K vào MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF059a (SEQ ID NO: 83)
- Đưa Q311R/D413K vào MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
- Đưa Q311R vào MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF060a (SEQ ID NO: 85)

Các gen chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra như được thể hiện trong Bảng 51 dưới đây bằng cách kết hợp gen vùng hằng định chuỗi nặng được tạo ra ở đây với gen của vùng biến đổi chuỗi nặng A375 (SEQ ID NO: 43), hoặc A551 (SEQ ID NO: 51).

Bảng 51

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Vùng biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO)	Vùng hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO)
A375-SCF025	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF025 (SEQ ID NO: 64)
A375-SCF027	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF027 (SEQ ID NO: 66)
A375-SCF028	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF028 (SEQ ID NO: 67)
A375-SCF030	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF030 (SEQ ID NO: 68)
A375-SCF032	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF032 (SEQ ID NO: 69)
A375-SCF033	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF033 (SEQ ID NO: 70)
A375-SCF039	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF039 (SEQ ID NO: 71)
A375-SCF040	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF040 (SEQ ID NO: 73)
A375-SCF041aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
A375-SCF043aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
A375-SCF056aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
A375-SCF057aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
A375-SCF059aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
A375-SCF060a	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF060a (SEQ ID NO: 85)
A551-SCF025a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF025a (SEQ ID NO: 65)
A551-SCF039a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF039a (SEQ ID NO: 72)
A551-SCF041a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF041a (SEQ ID NO: 74)
A551-SCF041aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
A551-SCF043a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF043a (SEQ ID NO: 77)
A551-SCF043aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
A551-SCF056a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF056a (SEQ ID NO: 79)

A551-SCF056aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
A551-SCF057a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF057a (SEQ ID NO: 81)
A551-SCF057aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
A551-SCF059a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF059a (SEQ ID NO: 83)
A551-SCF059aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
A551-SCF060a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF060a (SEQ ID NO: 85)

Ngoài ra, bằng cách kết hợp các gen chuỗi nặng của kháng thể này với các gen B167-Lamlib, B256-Lamlib, và B379-Lamlib được tạo ra trong Ví dụ 5-3 là các gen chuỗi nhẹ của kháng thể, kháng thể mong muốn được biểu hiện và tinh chế như được thể hiện trong Bảng 52 bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Bảng 52

Vùng biến đổi (chuỗi nặng/ chuỗi nhẹ)	Vùng hằng định chuỗi nặng	Vùng hằng định chuỗi nhẹ	Tên kháng thể
A375 / B167 (A375 SEQ ID NO: 43) (B167 SEQ ID NO: 54)	SCF025 (SEQ ID NO: 64)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF025/B167-LamLib
	SCF027 (SEQ ID NO: 66)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF027/B167-LamLib
	SCF028 (SEQ ID NO: 67)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF028/B167-LamLib
	SCF030 (SEQ ID NO: 68)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF030/B167-LamLib
	SCF032 (SEQ ID NO: 69)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF032/B167-LamLib
	SCF033 (SEQ ID NO: 70)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF033/B167-LamLib
	SCF039 (SEQ ID NO: 71)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF039/B167-LamLib
	SCF040 (SEQ ID NO: 73)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF040/B167-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF059aPh/B167-LamLib
	SCF060a (SEQ ID NO: 85)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF060a/B167-LamLib
A551 / B256 (A551 SEQ ID NO: 51) (B256 SEQ ID NO: 59)	SCF025a (SEQ ID NO: 65)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF025a/B256-LamLib
	SCF039a (SEQ ID NO: 72)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF039a/B256-LamLib
	SCF041a (SEQ ID NO: 74)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041a/B256-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
	SCF043a (SEQ ID NO: 77)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043a/B256-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
	SCF056a (SEQ ID NO: 79)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056a/B256-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056aPh/B256-LamLib
	SCF057a (SEQ ID NO: 81)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057a/B256-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
	SCF059a (SEQ ID NO: 83)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059a/B256-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059aPh/B256-LamLib
A551 / B379 (A551 SEQ ID NO: 51) (B379 SEQ ID NO: 60)	SCF039a (SEQ ID NO: 72)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF039a/B379-LamLib
	SCF041a (SEQ ID NO: 74)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041a/B379-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
	SCF043a (SEQ ID NO: 77)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043a/B379-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
	SCF056a (SEQ ID NO: 79)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056a/B379-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
	SCF057a (SEQ ID NO: 81)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057a/B379-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
	SCF059a (SEQ ID NO: 83)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059a/B379-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
	SCF060a (SEQ ID NO: 85)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF060a/B379-LamLib

(7-3) Sự tạo thành các kháng thể đối chứng để so sánh hoạt tính chủ vận

Các kháng thể (IC17HdK-MY201/IC17L-k0; IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0; IC17HdK-MY518/IC17L-k0; IC17HdK-MY518a/IC17L-k0; IC17HdK-P253/IC17L-k0; IC17HdK-P587/IC17L-k0; IC17HdK-TT16/IC17L-k0) có vùng biến đổi chuỗi nặng IC17HdK (SEQ ID NO: 152) được tạo ra trong Ví dụ 7-1 làm kháng thể đối chứng để so sánh hoạt tính chủ vận được tạo ra. Ngoài ra, kháng thể quan tâm (IC17HdK-G4d/IC17L-k0) được biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này bằng cách kết hợp gen của chuỗi nhẹ của kháng thể IC17L-k0 (SEQ ID NO: 158, vùng biến đổi; SEQ ID NO: 141, vùng hằng định) với gen của chuỗi nặng của kháng thể IC17HdK-G4d mà được tạo ra bằng cách kết hợp gen của vùng biến đổi chuỗi nặng IC17HdK (SEQ ID NO: 152) với gen G4d (SEQ ID NO: 159) từ đó Gly và Lys của tận cùng C của vùng hằng định chuỗi nặng của IgG4 người đã được loại bỏ. Các kháng thể đối chứng này được sử dụng trong Ví dụ 5.

(7-4) Đánh giá khả năng liên kết với thụ thể Fcγ người của các biến thể có pI tăng bằng cách cải biến axit amin của vùng hằng định

Biacore T200 (GE Healthcare) được sử dụng để đánh giá hoạt tính liên kết với thụ thể Fcγ người tương ứng (sau đây được đề cập đến là FcγR). Phép đo được thực hiện ở 25°C sử dụng 50 mM phosphat, 150 mM NaCl, 0,05% khối lượng/thể tích-P20, pH 7,4 làm hệ đệm. Khoảng 1000 RU kháng thể bị bắt giữ bằng chip cảm biến được giữ cố định bằng thể tiếp hợp biotin động học Fab-lambda của người CaptureSelect™ (Thermo Fisher Scientific) làm phân tử để bắt giữ phối tử. FcγR người được pha loãng đến 8 nM đối với FcγRIa và 1000 nM đối với FcγR khác trong hệ đệm đo, và nó được tương tác với kháng thể bị bắt giữ. Hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể với FcγR được đánh giá bằng cách tính toán lượng liên kết FcγR (RU) trên mỗi lượng đơn vị kháng thể sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0.

Miền ngoại bào của FcγR được điều chế bằng phương pháp dưới đây. Đầu tiên, quá trình tổng hợp gen miền ngoại bào của FcγR được thực hiện bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tại thời điểm này, trình tự FcγR được điều chế dựa trên dữ liệu được đăng ký NCBI. Cụ thể là, trình tự FcγRI được tạo ra dựa trên số đăng ký NCBI NM_000566.3, trình tự FcγRIIa trên số đăng ký NCBI NM_001136219.1, trình tự FcγRIIb trên số đăng ký

NCBI NM_004001.3, và trình tự FcγRIIIa trên số đăng ký NCBI NM_001127593.1; và đuôi His được bổ sung vào tận cùng C của chúng. Vị trí đa hình của FcγRIIa được tạo ra bằng cách như được đề cập đến trong J. Exp. Med., 1990, 172, 19-25; và vị trí đa hình của FcγRIIIa được tạo ra bằng cách như được đề cập đến trong J. Clin. Invest., 1997, 100, 1059-1070. Đoạn gen thu được được cài xen vào vector biểu hiện tế bào động vật để tạo ra các vector biểu hiện. Các vector biểu hiện được tạo ra được đưa nhanh vào các tế bào có nguồn gốc từ tế bào phôi thận của người FreeStyle293 (Invitrogen), và các protein quan tâm được biểu hiện. Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu thập và sau đó được đưa qua bộ lọc 0,22 μm, và chúng được tinh chế theo nguyên tắc bốn bước dưới đây. Bước thứ nhất được thực hiện bằng sắc ký cột trao đổi cation (SP Sepharose FF), bước thứ hai được thực hiện bằng sắc ký cột ái lực (HisTrap HP) đối với đuôi His, bước thứ ba được thực hiện bằng sắc ký cột lọc gel (Superdex200), và bước thứ tư được thực hiện bằng cách lọc vô trùng. Tuy nhiên, đối với FcγRI, sắc ký cột trao đổi anion bằng Q Sepharose FF được thực hiện ở bước thứ nhất. Các nồng độ của protein được tinh chế được tính toán bằng cách đo độ hấp thụ ở 280 nm sử dụng quang phổ kế và hệ số độ hấp thụ được tính toán từ các giá trị thu được bằng phương pháp theo PACE *et al.* (Protein Science, 1995, 4, 2411-2423).

Bảng 53 thể hiện lượng liên kết trên mỗi lượng đơn vị kháng thể, cũng như lượng tương ứng với lượng liên kết A375-G1T3/B167-Lamlib. Tất cả các kháng thể trong Bảng 53 thể hiện lượng liên kết đối với FcγRIIb người trên mỗi lượng đơn vị kháng thể lớn hơn so với lượng liên kết của A375-G1T3/B167-Lamlib, và giá trị tương đối là 2,85-14,26 khi lượng liên kết của A375-G1T3/B167-Lamlib với FcγRIIb người được đặt là 1,0. Lượng liên kết với FcγRIIb người trên mỗi lượng đơn vị kháng thể và các giá trị tương đối của lượng liên kết là tương tự khi có mặt hoặc không có mặt các cải biến axit amin để làm tăng pI của vùng hằng định. Ngoài ra, lượng liên kết các kháng thể chứa cải biến L235W với hFcγRIa bị giảm so với lượng liên kết của A375-TT14/B167-Lamlib.

Hoạt tính liên kết của mỗi FcγR của người

Bảng 53

Tên viết tắt	Lượng liên kết trên mỗi 1PR của kháng thể (RU)						Giá trị tương đương của lượng liên kết					
	hFcγRIa	hFcγRIIaH	hFcγRIIa	hFcγRIIaR	hFcγRIIb	hFcγRIIaF	hFcγRIa	hFcγRIaH	hFcγRIIaR	hFcγRIIb	hFcγRIIaF	hFcγRIIaV
A375-GIT3/B167-Lamlib	0,0813	0,0567	0,0463	0,0110	0,0213	0,0700	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A375-MY201a/B167-Lamlib	0,0396	0,0534	0,0338	0,0401	0,0007	0,0024	0,49	0,94	0,73	3,66	0,04	0,03
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	0,0040	0,0328	0,0335	0,0313	0,0007	0,0011	0,05	0,58	0,72	2,85	0,03	0,02
A375-MY518/B167-Lamlib	0,0020	0,0466	0,0460	0,0482	0,0009	0,0015	0,02	0,82	0,99	4,40	0,04	0,02
A375-MY518a/B167-Lamlib	0,0033	0,0479	0,0470	0,0489	0,0006	0,0009	0,04	0,84	1,01	4,46	0,03	0,01
A375-TT11/B167-Lamlib	0,0075	0,0020	0,0041	0,0477	-0,0009	-0,0010	0,09	0,03	0,09	4,35	-0,04	-0,01
A375-TT14/B167-Lamlib	0,0045	0,0042	0,0067	0,0805	0,0000	0,0003	0,05	0,07	0,14	7,34	0,00	0,00
A375-TT16/B167-Lamlib	0,0034	0,0126	0,0359	0,1090	0,0001	-0,0002	0,04	0,22	0,77	9,94	0,00	0,00
A375-P587/B167-Lamlib	0,0962	0,0029	0,0371	0,1427	0,0001	0,0001	1,18	0,05	0,80	13,02	0,00	0,00
A375-P253/B167-Lamlib	0,0937	0,0497	0,1678	0,1563	0,0056	0,0019	1,15	0,88	3,62	14,26	0,26	0,03
A375-SCF025/B167-Lamlib	0,0022	0,0514	0,0519	0,0512	0,0012	0,0014	0,03	0,91	1,12	4,67	0,06	0,02
A375-SCF025a/B167-Lamlib	0,0021	0,0514	0,0518	0,0511	0,0009	0,0016	0,03	0,91	1,12	4,67	0,04	0,02
A375-SCF027/B167-Lamlib	0,0044	0,0031	0,0058	0,0766	-0,0005	-0,0006	0,05	0,06	0,12	6,99	-0,02	-0,01
A375-SCF028/B167-Lamlib	0,0027	0,0101	0,0299	0,0995	-0,0009	-0,0010	0,03	0,18	0,64	9,08	-0,04	-0,01
A375-SCF030/B167-Lamlib	0,0020	0,0533	0,0532	0,0532	0,0017	0,0020	0,02	0,94	1,15	4,85	0,08	0,03
A375-SCF032/B167-Lamlib	0,0049	0,0030	-0,0004	0,0782	-0,0007	-0,0007	0,06	0,05	-0,01	7,14	-0,03	-0,01
A375-SCF033/B167-Lamlib	0,0033	0,0103	0,0255	0,0979	0,0000	0,0002	0,04	0,18	0,55	8,94	0,00	0,00
A375-SCF039/B167-Lamlib	0,0018	0,0535	0,0542	0,0531	0,0008	0,0013	0,02	0,94	1,17	4,85	0,04	0,02
A375-SCF039a/B167-Lamlib	0,0018	0,0542	0,0554	0,0540	0,0012	0,0013	0,02	0,96	1,20	4,93	0,06	0,02
A375-SCF040/B167-Lamlib	0,0016	0,0454	0,0446	0,0465	0,0010	0,0013	0,02	0,80	0,96	4,24	0,05	0,02
A375-SCF041a/B167-Lamlib	0,0446	0,0571	0,0376	0,0433	0,0009	0,0022	0,55	1,01	0,81	3,95	0,04	0,03
A375-SCF042a/B167-Lamlib	0,0396	0,0522	0,0327	0,0393	0,0003	0,0014	0,49	0,92	0,71	3,59	0,01	0,02
A375-SCF043a/B167-Lamlib	0,0429	0,0552	0,0361	0,0419	0,0011	0,0025	0,53	0,97	0,78	3,82	0,05	0,04
A375-SCF056a/B167-Lamlib	0,0395	0,0529	0,0331	0,0399	0,0011	0,0023	0,49	0,93	0,71	3,64	0,05	0,03
A375-SCF057a/B167-Lamlib	0,0405	0,0525	0,0367	0,0412	0,0013	0,0025	0,50	0,93	0,79	3,76	0,06	0,04
A375-SCF059a/B167-Lamlib	0,0380	0,0502	0,0319	0,0358	0,0010	0,0021	0,47	0,88	0,69	3,27	0,05	0,03
A375-SCF060a/B167-Lamlib	0,0021	0,0463	0,0459	0,0472	0,0011	0,0008	0,03	0,82	0,99	4,31	0,05	0,01
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	0,0013	0,0371	0,0371	0,0350	0,0007	0,0005	0,02	0,65	0,80	3,20	0,03	0,01
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	0,0011	0,0349	0,0349	0,0339	0,0001	0,0001	0,01	0,62	0,75	3,10	0,00	0,00
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	0,0019	0,0314	0,0299	0,0292	0,0010	0,0010	0,02	0,55	0,64	2,67	0,05	0,01
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	0,0021	0,0365	0,0364	0,0345	-0,0003	0,0005	0,03	0,64	0,79	3,15	-0,02	0,01
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	0,0089	0,0332	0,0319	0,0291	0,0003	0,0028	0,11	0,59	0,69	2,66	0,01	0,04

(7-5) Đánh giá khả năng liên kết với FcRn của người của các biến thể có pI tăng bằng cách cải biến axit amin của vùng hằng định

Biacore T200 (GE Healthcare) được sử dụng để đánh giá hoạt tính liên kết với FcRn của người. Phép đo được thực hiện ở 25°C sử dụng 50 mM phosphat, 150 mM NaCl, 0,05% khối lượng/thể tích-P20, pH 6,0 làm hệ đệm. Các protein FcRn của người sử dụng cho quá trình xác định này được điều chế bằng quy trình được mô tả trong WO2010107110. Khoảng 400 RU kháng thể bị bắt giữ bằng chip cảm biến được giữ cố định bằng thể tiếp hợp biotin động học Fab-lambda của người CaptureSelect™ (Thermo Fisher Scientific) làm phân tử để bắt giữ phối tử, sau đó là khả năng liên kết của FcRn của người được pha loãng trong hệ đệm đo. Hoạt tính của các kháng thể tương ứng để liên kết FcRn được đánh giá bằng cách tính KD (mol/L) bằng mô hình trạng thái ổn định sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 2.0. Các giá trị KD là tương tự khi có mặt hoặc không có mặt các cải biến axit amin để làm tăng pI của vùng hằng định. Bảng 54 thể hiện KD (mol/L) của các kháng thể tương ứng đối với FcRn của người.

Bảng 54

Tên viết tắt	K_D (mol/L)
A375-G1T3/B167-Lamlib	1,27E-06
A375-MY201a/B167-Lamlib	1,19E-06
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	1,18E-06
A375-MY518/B167-Lamlib	1,27E-06
A375-MY518a/B167-Lamlib	1,32E-06
A375-TT11/B167-Lamlib	1,56E-06
A375-TT14/B167-Lamlib	1,77E-06
A375-TT16/B167-Lamlib	1,51E-06
A375-P587/B167-Lamlib	1,70E-06
A375-P253/B167-Lamlib	1,42E-06
A375-SCF025/B167-Lamlib	1,10E-06
A375-SCF025a/B167-Lamlib	1,13E-06
A375-SCF027/B167-Lamlib	1,33E-06
A375-SCF028/B167-Lamlib	1,27E-06
A375-SCF030/B167-Lamlib	8,63E-07
A375-SCF032/B167-Lamlib	9,66E-07
A375-SCF033/B167-Lamlib	8,74E-07
A375-SCF039/B167-Lamlib	1,09E-06
A375-SCF039a/B167-Lamlib	1,11E-06
A375-SCF040/B167-Lamlib	1,46E-06
A375-SCF041a/B167-Lamlib	1,10E-06
A375-SCF042a/B167-Lamlib	1,49E-06
A375-SCF043a/B167-Lamlib	1,18E-06
A375-SCF056a/B167-Lamlib	9,56E-07
A375-SCF057a/B167-Lamlib	9,28E-07
A375-SCF059a/B167-Lamlib	1,03E-06
A375-SCF060a/B167-Lamlib	1,01E-06
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	1,13E-06
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	1,21E-06
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	1,00E-06
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	9,09E-07
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	1,05E-06

Ví dụ 8: Thu hồi các kháng thể CD137 phụ thuộc kynurenin (Kyn)

(8-1) Thu hồi các kháng thể có hoạt tính liên kết với CD137 của người phụ thuộc kynurenin từ thư viện kháng thể được thiết kế một cách hợp lý

Các kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết với CD137 của người khi có mặt kynurenin và không có hoạt tính liên kết khi không có kynurenin thu được từ thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể được thiết kế một cách hợp lý (thư viện kynurenin) để thu được các kháng thể chuyển kynurenin sử dụng phương pháp phân tích trọng lượng kháng lại kynurenin, được tạo thành như được mô tả trong WO2015/083764. Đối với quá trình thu thập, các kháng nguyên được biotin hóa được liên kết bởi các thể thực khuẩn khi có mặt kynurenin bị bắt giữ bởi các hạt, và các thể thực khuẩn trình diện kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết đối với kháng nguyên khi có mặt kynurenin được thu hồi. Các thể thực khuẩn sau đó được thu gom từ dịch rửa giải được rửa giải khỏi các hạt.

Các thể thực khuẩn được tạo ra bằng cách chung từ *E. coli* mang phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành. Cụ thể là, *E. coli* mang vectơ phagemid đã tạo thành được gây nhiễm M13KO7ΔpIII (được ký hiệu là “hyperphage”) (PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Dung dịch thư viện thể thực khuẩn thu được bằng cách pha loãng quần thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện bằng dung dịch muối đệm Tris (TBS). BSA sau đó được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện bằng cách sử dụng kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm. Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific), FG beads NeutrAvidin (Takara), hoặc Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies) được sử dụng làm các hạt nam châm. Đối với kháng nguyên, hCD137-Fc được biotin hóa (hCD137-Fc-Bio) được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 1-3 (điều chế CD137 của người dung hợp Fc được biotin hóa) được sử dụng.

Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện để thu được một cách hiệu quả các kháng thể chuyển phân tử nhỏ phụ thuộc vào phân tử nhỏ mà có thể đóng vai trò chuyển ở các mô ung thư. Cụ thể là, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể mà liên kết với kháng nguyên khi có mặt kynurenin là phân tử nhỏ, và không liên kết với kháng nguyên khi không có kynurenin được thực hiện

khi dựa vào các phương pháp được mô tả trong patent WO2015/083764 trước đó. Ở vòng 1, quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện trên hCD137-Fc-Bio hoặc kynurenin được biotin hóa (bio-Kyn) (hợp chất 028 (được biểu diễn bằng [Công thức 28]), 029 (được biểu diễn bằng [Công thức 29]), và 036 (được biểu diễn bằng [Công thức 36]) như được mô tả trong WO2015/083764). Quá trình phân tích trọng lượng đối với hCD137-Fc-Bio được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch thể thực khuẩn vào kháng nguyên, sau đó là thu hồi thể thực khuẩn được liên kết với kháng nguyên bằng các hạt nam châm; và quá trình phân tích trọng lượng đối với bio-Kyn được thực hiện theo cách bổ sung dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị sau khi cố định lần thứ nhất kháng nguyên được biotin hóa trên các hạt nam châm. Đối với Bio-Kyn, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể mà có khả năng liên kết kháng nguyên khi không có kynurenin làm phân tử nhỏ được thực hiện dựa vào phương pháp được mô tả trong patent WO2015/083764 nêu trên. Đối với hCD137-Fc-Bio, 4 nmol vùng Fc IgG1 không được biotin hóa của người được bổ sung để loại bỏ các kháng thể liên kết với vùng Fc. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được bổ sung vào chủng *E. coli* ER2738 để gây nhiễm thể thực khuẩn với *E. coli*, sau đó *E. coli* đã thu hồi được gây nhiễm hyperphage, và thể thực khuẩn được thu hồi từ chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C.

Sau vòng 2, quá trình phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt kynurenin và không liên kết với kháng nguyên khi không có kynurenin được thực hiện trên hCD137-Fc-Bio dựa vào phương pháp được thể hiện trong patent WO2015/083764 trước đó. Ở cả hai trường hợp, 4 nmol vùng Fc IgG1 không được biotin hóa của người được bổ sung để loại bỏ các kháng thể liên kết với vùng Fc đối với hCD137-Fc-Bio. Quá trình phân tích trọng lượng tương tự được lặp lại tới vòng 5 để làm giàu trình tự kháng thể quan tâm.

(8-2) Thu thập các kháng thể liên kết với hCD137 khi có mặt kynurenin từ thư viện kháng thể

(8-2-1) Điều chế hCD137p12-FX-Fc-Bio

hCD137p12-FX-Fc-Bio được điều chế theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa trình tự có thể phân cắt được Factor Xa và đoạn gen mã hóa vùng hằng định kháng thể được nối với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa miền ngoại bào CD137 của người. Đoạn

gen mã hóa protein (hCD137p12-FX-Fc-Bio, SEQ ID NO: 160) trong đó phần ngoại bào của CD137 của người, trình tự có thể phân cắt được Factor Xa và vùng hằng định kháng thể được liên kết, được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật. Vector plasmit đã hình thành được đưa vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng 293-fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, vector plasmit chứa các gen biểu hiện BirA và EBNA1 (SEQ ID NO: 88) được đưa vào cùng lúc. Biotin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Các tế bào được chuyển hóa bằng các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂, và hCD137p12-FX-Fc-Bio được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy này được thu thập. Protein A được sử dụng để tinh chế hCD137p12-FX-Fc-Bio từ chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Với việc sử dụng thư viện được thiết kế một cách hợp lý, người ta cho rằng quá trình phân tích trọng lượng các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết kháng nguyên chỉ khi có mặt phân tử nhỏ, có thể thu được các kháng thể chuyển phân tử nhỏ bộc lộ hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt phân tử nhỏ. Nghĩa là, từ thư viện kynurenin được tạo thành theo cách được mô tả trong WO2015/083764, các thể thực khuẩn trình diện kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết khi có mặt kynurenin đối với hCD137 bị bắt giữ trong các hạt được thu hồi. Theo phương pháp thu thập này, hCD137-Fc được biotin hóa (hCD137-Fc-Bio) được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 1-3 (điều chế CD137 của người dung hợp Fc được gắn nhãn biotin) hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio được sử dụng làm kháng nguyên.

E. coli mang vector phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành như mô tả trong WO2015/083764 được gây nhiễm M13KO7ΔpIII (hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt sau khi nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Dung dịch thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đa trị được chuẩn bị bằng cách pha loãng bằng TBS quần thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện. BSA sau đó được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng với kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm được thực hiện. FG beads NeutrAvidin (Takara) hoặc Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies) được sử dụng làm các hạt nam châm.

Ở vòng 1 của quá trình phân tích trọng lượng, việc làm giàu các thể thực khuẩn mà có khả năng liên kết với kháng nguyên khi có mặt kynurenin được thực hiện. Cụ thể là, thư viện thể thực khuẩn được tiếp xúc với kháng nguyên và kynurenin trong một giờ ở nhiệt độ phòng bằng cách bổ sung vào 0,8 mL dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị, nồng độ cuối cùng là 500 μ M kynurenin và 4 nmol vùng Fc IgG1 không được biotin hóa của người (hFC) với 125 pmol kháng nguyên được gắn nhãn biotin. Các hạt nam châm phong bế BSA (FG beads NeutrAvidin) được bổ sung vào, và các phức hợp thể thực khuẩn kháng nguyên được cho liên kết với các hạt nam châm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa hai lần bằng 0,5 mL kynurenin/ TBST và một lần bằng kynurenin/TBS. Sau đó, 0,5 mL dung dịch trypsin 1 mg/mL được bổ sung vào hỗn hợp. Sau khi hỗn hợp được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt ngay lập tức được phân tách bằng giá nam châm. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được bổ sung vào 20 ml chủng *E. coli* ER2738 trong pha sinh trưởng log (OD₆₀₀ 0.4-0.7). *E. coli* được gây nhiễm các thể thực khuẩn bằng cách nuôi cấy *E. coli* ở 37°C trong một giờ và khuấy nhẹ nhàng. *E. coli* đã gây nhiễm được gieo vào các đĩa 225 mm x 225 mm. Thư viện thể thực khuẩn trình diện kháng thể đơn trị sau đó được chuẩn bị bằng cách gây nhiễm môi trường nuôi cấy của *E. coli* đã được gieo bằng M13KO7TC (WO2015046554A1) (thể thực khuẩn phụ) (Takara) và thu thập các thể thực khuẩn từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C.

Đối với quá trình phân tích trọng lượng vòng 2, thư viện thể thực khuẩn được tiếp xúc với kháng nguyên và kynurenin trong một giờ ở nhiệt độ phòng bằng cách bổ sung vào 0,8 mL dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị, nồng độ cuối cùng là 500 μ M kynurenin và 4 nmol vùng Fc IgG1 của người không được gắn nhãn biotin cùng với 40 pmol kháng nguyên được gắn nhãn biotin. Các hạt nam châm phong bế BSA (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) được bổ sung vào, và các phức hợp thể thực khuẩn kháng nguyên được cho liên kết với các hạt nam châm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa hai lần bằng 0,5 mL kynurenin/ TBST và một lần bằng kynurenin/TBS. Sau đó, 0,5 mL dung dịch trypsin 1 mg/mL được bổ sung vào hỗn hợp. Sau khi hỗn hợp được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt ngay lập tức được

phân tách bằng giá nam châm. Sau đó, dung dịch thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đơn trị được điều chế tương tự như vòng 1 ở trên.

Đối với quá trình phân tích trọng lượng vòng 3, thư viện thể thực khuẩn được tiếp xúc với kháng nguyên và kynurenin trong một giờ ở nhiệt độ phòng bằng cách bổ sung 0,8 mL dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị, nồng độ cuối cùng là 500 μ M kynurenin và 4 nmol vùng Fc IgG1 của người không được gắn nhãn biotin cùng với 10 pmol kháng nguyên được gắn nhãn biotin. Các hạt nam châm phong bế BSA (FG beads NeutrAvidin) được bổ sung vào, và các phức hợp thể thực khuẩn kháng nguyên được cho liên kết với các hạt nam châm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng 0,5 mL kynurenin/ TBST và hai lần bằng kynurenin/TBS. Sau đó, 0,5 mL dung dịch trypsin 1 mg/mL được bổ sung vào hỗn hợp. Sau khi hỗn hợp được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt ngay lập tức được phân tách bằng giá nam châm. Sau đó, dung dịch thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đơn trị được điều chế tương tự như vòng 1 ở trên. Đối với quá trình phân tích trọng lượng vòng 4, quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện ở các điều kiện tương tự như quá trình phân tích trọng lượng vòng 3. Tuy nhiên, Dynabeads MyOne Streptavidin T1 được sử dụng làm hạt nam châm.

(8-3) Thu thập các kháng thể liên kết với CD137 của người khi có mặt kynurenin từ các thư viện kháng thể sử dụng các kháng nguyên được biotin hóa SS và phương pháp chọn lọc âm tính

(8-3-1) Điều chế hCD137p12-FX-Fc

hCD137p12-FX-Fc được điều chế theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa trình tự có thể phân cắt được Factor Xa và đoạn gen mã hóa vùng hằng định kháng thể được nối với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa miền ngoại bào CD137 của người. Đoạn gen mã hóa protein trong đó phần ngoại bào của CD137 của người, trình tự có thể phân cắt được Factor Xa và vùng hằng định kháng thể được liên kết (hCD137p12-FX-Fc, SEQ ID NO: 160) được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật. Vector plasmit đã hình thành được đưa vào các tế bào FreeStyle293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng 293-fectin (Invitrogen). Tại thời điểm này, vector plasmit chứa các gen biểu hiện EBNA1 (SEQ ID NO: 88) được đưa vào cùng lúc. Các tế bào được chuyển hóa

bằng các gen theo quy trình được đề cập ở trên được nuôi cấy ở 37°C, 8% CO₂, và hCD137p12-FX-Fc-Bio được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Protein A được sử dụng để tinh chế hCD137p12-FX-Fc-Bio từ chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào này.

(8-3-2) Thu thập các kháng thể liên kết với CD137 của người khi có mặt kynurenin từ thư viện kháng thể bằng cách sử dụng các kháng nguyên được biotin hóa SS và phương pháp chọn lọc âm tính

Khi thu được các kháng thể chuyển phân tử nhỏ bộc lộ hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt phân tử nhỏ, nó được cho rằng sau khi các thể thực khuẩn hiển thị kháng thể được liên kết với kháng nguyên bằng các hạt nam châm được bắt giữ sử dụng kháng nguyên được biotin hóa (được biotin hóa SS) thông qua liên kết với liên kết disulfua (liên kết SS), chỉ các thể thực khuẩn hiển thị kháng thể được liên kết với kháng nguyên có thể được rửa giải ra khỏi các hạt bằng cách sử dụng dithiothreitol (DTT) hoặc tương tự để phân cắt các liên kết SS ở các điều kiện khử. Thư viện kynurenin được tạo thành như được mô tả trong WO2015/083764 được sàng lọc cho các kháng thể mà thể hiện hoạt tính liên kết với kháng nguyên khi có mặt kynurenin. Đối với quá trình sàng lọc, thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể đầu tiên được tiếp xúc với các hạt nam châm kháng nguyên được gắn nhãn biotin hóa khi không có kynurenin, và các thể thực khuẩn hiển thị các kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên ngay cả khi không có kynurenin được loại bỏ. Quá trình sàng lọc tiếp theo đối với các kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên được thực hiện chỉ khi có mặt kynurenin bằng cách thực hiện quá trình phân tích trọng lượng tương tự ở các điều kiện khi có mặt kynurenin. Trong phương pháp này, kháng nguyên được gắn nhãn biotin (kháng nguyên được biotin hóa SS) được sử dụng làm kháng nguyên theo các quy trình đi kèm sử dụng hCD137-Fc được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 1-4, hoặc hCD137p12-FX-Fc được điều chế trong (8-3-1) và bộ kit EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinylation (Thermo Fisher Scientific). Lưu ý rằng hCD137-Fc-Bio được điều chế bằng phương pháp theo Ví dụ 1-3 hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio được điều chế trong (8-2-1) được sử dụng cho quá trình chọn lọc âm tính.

E. coli mang vector phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành như mô tả trong WO2015/083764 được gây nhiễm M13KO7ΔpIII (hyperphage)

(PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt sau khi nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Các thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đa trị được chuẩn bị bằng cách pha loãng bằng TBS quần thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện. BSA sau đó được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng với kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm được thực hiện. Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific), FG beads NeutrAvidin (Takara Shigenator), hoặc Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies) được sử dụng làm các hạt nam châm.

Ở vòng 1 của quá trình phân tích trọng lượng, việc làm giàu các thể thực khuẩn mà có khả năng liên kết với kháng nguyên khi có mặt kynurenin được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp chọn lọc âm tính. Cụ thể là, 800 pmol hCD137-Fc-Bio hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio được bổ sung vào Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin được phong bế bằng sữa tách béo mà được ủ trước bằng Streptavidin (Roche) và cho phép liên kết trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng TBST, và 0,8 mL dung dịch thư viện thể thực khuẩn phong bế BSA được bổ sung vào và cho phép liên kết trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Bằng cách phân tách các hạt bằng giá nam châm, các kháng nguyên và các thể thực khuẩn không liên kết với các hạt được thu thập.

Sau đó, 225 pmol hCD137-Fc được biotin hóa SS hoặc 450 pmol hCD137p12-FX-Fc-Bio được biotin hóa SS được bổ sung vào các hạt FG NeutrAvidin được phong bế bằng sữa tách béo đã được ủ với Streptavidin (Roche), và cho phép liên kết trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng TBST, và nồng độ cuối cùng là 0,2 mM kynurenin và 4 nmol hFc được bổ sung vào cùng với các thể thực khuẩn đã thu hồi; và thư viện thể thực khuẩn được tiếp xúc với kháng nguyên cũng như kynurenin trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa hai lần bằng 0,5 mL kynurenin/TBST (0,2 mM kynurenin, 0,1% Tween20, TBS, pH 7,4), và một lần với kynurenin/TBS (0,2 mM kynurenin, TBS, pH 7,4). Sau đó, 500 µL dung dịch TBS chứa nồng độ cuối cùng là 25 mM DTT được bổ sung và sau năm phút khuấy ở nhiệt độ phòng, các thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt riêng rẽ bằng cách sử dụng giá nam châm. Trypsin sau đó được bổ sung vào các hỗn hợp này đến nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt

độ phòng trong 15 phút trước khi các thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt riêng rẽ bằng cách sử dụng giá nam châm. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được bổ sung vào 20 ml chủng *E. coli* ER2738 trong pha sinh trưởng log (OD600 0.4-0.7). *E. coli* được gây nhiễm các thực khuẩn bằng cách nuôi cấy *E. coli* ở 37°C trong một giờ và khuấy nhẹ nhàng. *E. coli* đã gây nhiễm được gieo vào các đĩa 225 mm x 225 mm. Thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đa trị sau đó được điều chế bằng cách gây nhiễm môi trường nuôi cấy của *E. coli* đã được gieo với hyperphage, và thu hồi các thể thực khuẩn từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C.

Đối với quá trình phân tích trọng lượng vòng 2, 400 pmol hCD137-Fc-Bio hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio được bổ sung vào Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin được phong bế bằng sữa tách béo được ủ trước bằng Streptavidin (Roche), và cho phép liên kết trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Với các hạt được rửa ba lần bằng TBST, và 0,4 mL dung dịch thư viện thể thực khuẩn phong bế BSA được bổ sung vào và cho phép liên kết trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Bằng cách phân tách các hạt bằng giá nam châm, các kháng nguyên và các thể thực khuẩn không liên kết với các hạt được thu hồi. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được ủ lại với Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin mà đã được ủ với 400 pmol hCD137-Fc-Bio hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio theo quy trình tương tự, và sau đó các kháng nguyên và các thể thực khuẩn không liên kết với các hạt được thu thập bằng cách sử dụng giá nam châm.

56,3 pmol hCD137-Fc được biotin hóa SS hoặc 113 pmol hCD137p12-FX-Fc được biotin hóa SS được bổ sung vào các hạt FG NeutrAvidin được phong bế bằng sữa tách béo đã được ủ trước với Streptavidin (Roche), và cho phép liên kết trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng TBST, và nồng độ cuối cùng là 0,2 mM kynurenin và 4 nmol vùng Fc IgG1 của người không được biotin hóa được bổ sung vào cùng với các thể thực khuẩn đã thu hồi; và thư viện thể thực khuẩn được tiếp xúc với kháng nguyên cũng như kynurenin trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng 0,5 mL kynurenin/TBST (0,2 mM kynurenin, 0,1% Tween20, TBS, pH 7,4), và hai lần bằng kynurenin/TBS (0,2 mM kynurenin, TBS, pH 7,4). Sau đó, 500 µL dung dịch TBS chứa nồng độ cuối cùng là 25 mM DTT được bổ sung và sau năm phút khuấy ở nhiệt độ phòng, các thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt riêng rẽ bằng cách sử dụng giá nam châm. Sau đó,

dung dịch thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đa trị được điều chế tương tự như vòng 1 ở trên.

Đối với quá trình phân tích trọng lượng vòng 3, 200 pmol hCD137-Fc-Bio hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio được bổ sung vào Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin được phong bế bằng sữa tách béo mà đã được ủ trước với Streptavidin (Roche), và cho phép liên kết trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng TBST, và 0,2 mL dung dịch thư viện thể thực khuẩn phong bế BSA được bổ sung vào và cho phép liên kết trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Bằng cách phân tách các hạt bằng giá nam châm, các kháng nguyên và các thể thực khuẩn không liên kết với các hạt được thu hồi. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được ủ lại với Sera-Mag SpeedBeads được phủ NeutrAvidin mà đã được ủ với 200 pmol hCD137-Fc-Bio hoặc hCD137p12-FX-Fc-Bio theo quy trình tương tự, và sau đó các kháng nguyên và các thể thực khuẩn không liên kết với các hạt được thu hồi bằng cách sử dụng giá nam châm.

12,5 pmol hCD137-Fc được biotin hóa SS hoặc 25 pmol hCD137p12-FX-Fc được biotin hóa SS được bổ sung vào các hạt FG NeutrAvidin được phong bế bằng sữa tách béo mà đã được ủ với Streptavidin (Roche), và cho phép liên kết trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các hạt được rửa ba lần bằng TBST, và nồng độ cuối cùng là 0,2 mM kynurenin và 4 nmol vùng Fc IgG1 của người không được biotin hóa được bổ sung vào cùng với các thể thực khuẩn đã thu hồi; và thư viện thể thực khuẩn được tiếp xúc với kháng nguyên cũng như kynurenin trong một giờ ở nhiệt độ phòng.

Các hạt được rửa năm lần bằng 0,5 mL kynurenin/TBST (0,2 mM kynurenin, 0,1% Tween20, TBS, pH 7,4), và năm lần với kynurenin/TBS (0,2 mM kynurenin, TBS, pH 7,4). Sau đó, 500 μ L dung dịch TBS chứa nồng độ cuối cùng là 25 mM DTT được bổ sung và sau năm phút khuấy ở nhiệt độ phòng, các thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt riêng rẽ bằng cách sử dụng giá nam châm. Sau đó, dung dịch thư viện thể thực khuẩn hiển thị kháng thể đa trị được điều chế theo cách tương tự như vòng 1 ở trên. Đối với quá trình phân tích trọng lượng vòng 4, quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện ở các điều kiện tương tự như quá trình phân tích trọng lượng vòng 3. Tuy nhiên, Dynabeads MyOne Streptavidin T1 được sử dụng thay vì các hạt FG NeutrAvidin cho các hạt nam châm. Đối với quá trình

phân tích trọng lượng vòng 5, quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện ở các điều kiện tương tự như quá trình phân tích trọng lượng vòng 3.

(8-4) Đánh giá các kháng thể kháng CD137 phụ thuộc kynurenin được xác định bằng hiển thị thể thực khuẩn

(8 8-4) Sự biểu hiện và tinh chế các kháng thể chuyển làm thay đổi liên kết của chúng với các kháng nguyên bởi sự có mặt/không có mặt của kynurenin

Các gen mã hóa các vùng biến đổi của các kháng thể thu được từ các thư viện kynurenin được mô tả ở đây được cài xen vào các plasmid biểu hiện của động vật có IgG1 của người hoặc IgG1 của người được cải biến (P253) và chuỗi kappa. Tên dòng vô tính và số lượng trình tự được liệt kê trong Bảng 55.

Các dòng vô tính được đánh giá

Bảng 55

Tên dòng vô tính	SEQ ID NO của chuỗi nặng (độ dài đầy đủ)	SEQ ID NO của chuỗi nhẹ (độ dài đầy đủ)	Ví dụ
dBBK026-P253	161	169	8-1
dBBK051-P253	162	170	8-1
dBBK054-P253	163	171	8-1
dBBK060-P253	164	172	8-1
dBBK070-P253	165	173	8-1
dBBK101-P253	166	174	8-2
dBBK102-P253	167	175	8-2
dBBK143-P253	168	176	8-2

Các kháng thể được biểu hiện và được tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quang phổ kế được sử dụng để đo độ hấp thụ của dung dịch kháng thể được tinh chế ở 280 nm. Từ các giá trị đo thu được, các nồng độ của các kháng thể đã tinh chế được tính toán bằng cách sử dụng hệ số tắt được tính toán bằng phương pháp PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(8-4-2) Đánh giá tác động của kynurenin đối với khả năng liên kết với CD137 của người bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Biacore T200 (GE Healthcare) được sử dụng để phân tích tương tác của đáp ứng kháng nguyên-kháng thể giữa kháng thể kháng CD137 và hCD137-His-BAP (SEQ ID NO: 87). Chip cảm biến CM3 (GE Healthcare) được giữ cố định bằng lượng Sure protein A thích hợp bằng phương pháp ghép cặp amin được bắt giữ với kháng thể kháng CD137 để tương tác với hCD137-His-BAP được điều chế trong Ví dụ 1-1. TBS được sử dụng làm hệ đệm chạy, và 10 mM glyxin-HCl (pH 1,5) và 25 mM NaOH được sử dụng làm dung dịch tái sinh.

Sau khi bắt giữ kháng thể kháng CD137 được tạo huyền phù trong TBS, 500 nM hCD137-His-BAP được đưa vào mỗi tế bào dòng với tốc độ dòng là 10 μ L/phút trong ba phút. Khoảng thời gian ba phút này là pha liên kết cho hCD137-His-BAP, và sau khi pha liên kết kết thúc, khoảng thời gian năm phút để chuyển sang hệ đệm chạy là pha phân ly cho hCD137-His-BAP. Sau khi hoàn thành pha phân ly, dung dịch tái sinh được đưa vào với tốc độ dòng là 30 μ L/phút trong 10 giây. Trên đây là chu trình để đo hoạt tính liên kết của các kháng thể kháng CD137. Lượng liên kết của hCD137-His-BAP mà tương tác với kháng thể kháng CD137 trong pha liên kết được phân tích bằng phần mềm đánh giá Biacore T200 Version 2.0 được thể hiện trong Bảng 56.

Bảng 56 thể hiện lượng liên kết kháng nguyên khi có mặt kynurenin.

Bảng 56

Tên dòng vô tính	Không có phân tử nhỏ	500 μ M kynurenin
dBBK026-P253	18,2	60
dBBK047-P253	-2	10,4
dBBK051-P253	-2,3	30
dBBK054-P253	-2,2	3,6
dBBK060-P253	2,8	38,5
dBBK070-P253	-1,4	2,6
dBBK101-P253	-3,6	21,2
dBBK102-P253	-2,5	9,9
dBBK143-P253	-1,9	44,3

(8-4-3) Đánh giá hoạt tính liên kết của các kháng thể thu được đối với một phân trình tự CD137

(8-4-3-1) Điều chế kháng nguyên bằng một phần trình tự CD137

Các kháng nguyên với một phần trình tự CD137 được điều chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, đoạn gen mã hóa vùng hằng định kháng thể được liên kết với vùng cùng hướng của đoạn gen mã hóa một phần vùng ngoại bào CD137 của người. Đoạn gen mã hóa protein (Bảng 57) trong đó một phần miền ngoại bào CD137 của người và vùng hằng định kháng thể được liên kết được hợp nhất vào vector biểu hiện động vật. Vector plasmit hình thành được đưa vào các tế bào Expi293 (Invitrogen) bằng cách sử dụng ExpiFectamin293 (Invitrogen), và protein quan tâm được tiết vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy. Protein A được sử dụng từ chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy để tinh chế protein quan tâm.

Các kháng nguyên với một phần trình tự CD137

Bảng 57

Tên kháng nguyên có một phần trình tự CD137	SEQ ID NO
hCD137.1-F-G1d	177
hCD137.1.2-F.G1d	178
hCD137.2.4-F.G1d	179
hCD137.2.3-F.G1d	180
hCD137.3.4-F.G1d	181

(8-4-3-2) Xác nhận liên kết

Liệu các kháng thể thu được liên kết với các kháng nguyên có một phần trình tự CD137 có được đánh giá bằng ELISA hay không. Đầu tiên, các kháng nguyên khác nhau được điều chế trong Ví dụ 1 hoặc Ví dụ 8-4-3-1 được giữ cố định trên đĩa microtiter Maxisorp 384. Sau khi các kháng nguyên không liên kết được loại bỏ khỏi các đĩa bằng cách rửa mỗi giếng của đĩa bằng hệ đệm rửa, các giếng được phong bế bằng 50 μ L hệ đệm phong bế (TBS chứa BlockAce) trong 1 giờ hoặc lâu hơn. Đối với các giếng mà từ đó hệ đệm phong bế được loại bỏ, mỗi giếng được bổ sung 10 μ L các kháng thể đã tinh chế được điều chế ở 10 μ g/mL trong TBS với nồng độ cuối cùng là 500 μ M L-kynurenin hoặc TBS với nồng độ cuối cùng là 500 μ M kynurenin, và được để nghỉ trong một giờ. Các kháng thể kháng Kappa của người tiếp hợp với AP (BIOSOURCE) được pha loãng trong TBS với nồng độ cuối

cùng là 500 μM kynurenin được bổ sung vào mỗi giếng sau khi rửa bằng đệm rửa chứa nồng độ cuối cùng là 500 μM kynurenin (TBS với 0,1% Tween20). Sau một giờ ủ, chất nền phosphat BluePhos (KPL) được bổ sung sau khi rửa bằng hệ đệm rửa chứa 500 μM kynurenin. Quá trình hiện màu của dung dịch trong mỗi giếng được đo bằng độ hấp thụ ở 620 nm sau khi phản ứng hiện màu của dung dịch trong mỗi giếng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch dừng BluePhos. Tỷ lệ hấp thụ bằng cách đặt giá trị của giếng với nồng độ kháng thể 0 $\mu\text{g/mL}$ đến 1 được thể hiện. Bằng cách đánh giá khả năng liên kết có tỷ lệ hấp thụ là lớn hơn hoặc bằng 2, gợi ý rằng các dòng vô tính được đánh giá bao gồm các kháng thể bọc lộ các đặc tính liên kết khác nhau.

Bảng 58

Tên dòng vô tính	hCD137.1-F.G1d	hCD137.1.2-F.G1d	hCD137.2.4-F.G1d	hCD137.2.3-F.G1d	hCD137.3.4-F.G1d	hCD137-Fc	cyCD137-Fc-BAP
dBBK026-P253	1,0	1,2	1,2	1,1	4,2	5,7	8,3
dBBK047-P253	1,2	1,2	2,1	4,0	4,8	2,4	1,2
dBBK051-P253	1,2	1,2	1,2	1,2	3,3	3,7	5,9
dBBK054-P253	3,3	10,1	1,3	1,1	1,3	8,6	1,1
dBBK060-P253	1,2	1,4	1,4	1,2	1,2	4,9	1,0
dBBK070-P253	1,8	2,0	1,3	1,1	1,2	9,2	3,1
dBBK101-P253	1,3	1,2	1,1	1,0	1,1	3,7	5,3
dBBK102-P253	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	2,8	4,3

(8-5) Đánh giá hoạt tính *in vitro* của các kháng thể thu được

Dòng tế bào GloResponseTM NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega) được sử dụng để đo hoạt tính kháng thể *in vitro*. Bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 384 giếng, 10 μL tế bào Fc γ RIIB CHO-K1 được điều chế ở nồng độ $2 \times 10^6/\text{mL}$ bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS). Các dung dịch kháng thể có kynurenin hoặc không có kynurenin được bổ sung vào mỗi giếng ở 10 μL . Sau đó, 10 μL dòng tế bào GloResponseTM NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chế đến nồng độ $2 \times$

10⁶/mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Nồng độ cuối cùng của kynurenin là 500 μ M. Các đĩa được để yên trong sáu giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂, sau đó là 15 phút ở nhiệt độ phòng, và 30 μ L thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang của giếng không được bổ sung kháng thể là số lần phát quang và đóng vai trò làm chỉ số đánh giá hoạt tính của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 57.

Số lần phát quang là cao hơn khi nồng độ L-kynurenin là 500 μ M so với khi nồng độ L-kynurenin là 0 μ M, chỉ ra rằng hoạt tính chủ vận bị thay đổi bởi nồng độ hoặc sự có mặt của kynurenin.

Ví dụ 9: Thu thập các kháng thể liên kết với CD137 phụ thuộc ATP và AMP bằng cách lựa chọn vòng đôi

(9-1) Thu thập các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt ATP và AMP, tương ứng, từ thư viện được thiết kế một cách hợp lý bằng cách sử dụng phương pháp lựa chọn vòng đôi

Các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết với kháng nguyên khi có mặt phân tử nhỏ đặc hiệu đã thu được, nhưng việc thu thập các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết với kháng nguyên khi có mặt nhiều phân tử nhỏ khác nhau chưa được báo cáo. Một cách để giải quyết vấn đề này là xem xét sự thay đổi quá trình phân tích trọng lượng, mà làm thay đổi phân tử nhỏ được sử dụng cho mỗi vòng của quá trình phân tích trọng lượng, ví dụ, ATP và AMP. Tuy nhiên, trong trường hợp này, có một vấn đề là áp suất lựa chọn được áp dụng cho phân tử nhỏ tương ứng tại mỗi vòng, và do đó áp suất lựa chọn không thể được áp dụng đều nhau cho cả hai phân tử nhỏ cùng một lúc. Để giải quyết vấn đề này, phương pháp lựa chọn vòng đôi được bổ sung. Phương pháp lựa chọn vòng đôi là quy trình trong đó hai chu kỳ phân tích trọng lượng được thực hiện trên một kháng nguyên trong một vòng phân tích trọng lượng (J Mol Biol. 1992 Aug 5;226(3):889-96.). Ở đây, ví dụ, trong trường hợp phương pháp hiển thị thể thực khuẩn, một vòng dùng để chỉ bước thu hồi các thể thực khuẩn

từ *E. coli* để tái nhiễm *E. coli* bằng các thể thực khuẩn sau khi phân tích trọng lượng; và trong trường hợp phương pháp hiển thị ribosom, một vòng dùng để chỉ bước từ quá trình phiên mã *in vitro* để khuếch đại gen bằng PCR. Mặc dù việc lựa chọn vòng đôi cho một loại kháng nguyên đã được báo cáo, nhưng không có báo cáo về ứng dụng trong việc thu được các kháng thể phụ thuộc phân tử nhỏ, và dĩ nhiên là không có báo cáo về ứng dụng trong việc thu được các kháng thể thể hiện sự phụ thuộc vào nhiều phân tử nhỏ riêng biệt. Bằng cách cải biến phương pháp lựa chọn vòng đôi và áp dụng áp suất chọn lọc trên cả ATP và AMP trong một vòng, các tác giả tin rằng có thể thu được các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết kháng nguyên theo cách phụ thuộc ATP và AMP một cách hiệu quả hơn.

Các kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết kháng nguyên khi có mặt ATP và AMP thu được từ thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể được thiết kế một cách hợp lý được tạo thành ở patent WO2015/083764 trước đó. Các điều kiện phân tích trọng lượng được thể hiện trong Bảng 59. Điều kiện 1 và 2 được áp dụng cho điều kiện phân tích trọng lượng thông thường và điều kiện phân tích trọng lượng thay đổi nêu trên; trong khi điều kiện 3 được áp dụng cho phương pháp lựa chọn vòng đôi nêu trên. Ở đây, việc lựa chọn vòng đôi được thực hiện ở vòng 2 và vòng 3. hCD137-Fc được biotin hóa được sử dụng làm kháng nguyên.

Trong Bảng 59, ATP cho biết quá trình phân tích trọng lượng sử dụng ATP, AMP cho biết quá trình phân tích trọng lượng sử dụng AMP, và Đôi cho biết phân tích trọng lượng sử dụng lựa chọn vòng đôi.

Bảng 59

Điều kiện	Vòng 1	Vòng 2	Vòng 3
1	ATP	ATP	ATP
2	ATP	AMP	ATP
3	ATP	Đôi	Đôi

Các thể thực khuẩn được tạo ra bằng cách chung từ *E. coli* mang phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành. Cụ thể là, *E. coli* mang vector phagemid đã tạo thành được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015046554A1) hoặc M13KO7ΔpIII (hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Các thư viện hiển thị thể thực

khuẩn kháng thể được chuẩn bị bằng cách pha loãng bằng TBS, quần thể các thể thực khuẩn được kết tủa bằng cách bổ sung 2,5 M NaCl/10% PEG vào môi trường nuôi cấy *E. coli* trong đó sự sản sinh thể thực khuẩn được thực hiện.

BSA sau đó được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn ở nồng độ cuối cùng là 4%. Quá trình phân tích trọng lượng được thực hiện bằng cách sử dụng kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm. Đối với hạt nam châm, hạt NeutrAvidin (TAMAGAWA SEIKI) hoặc Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng.

Dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị được bổ sung hCD137-Fc được biotin hóa và ATP ở nồng độ cuối cùng là 1 mM và phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Các hạt nam châm phong bế được bổ sung vào dung dịch phản ứng của thể thực khuẩn và kháng nguyên, và chúng được phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Các hạt được rửa hai lần hoặc ba lần bằng hệ đệm TBS/0,1% Tween20 chứa 1 mM ATP, và một hoặc hai lần bằng TBS chứa 1 mM ATP. Các hạt mà TBS sau đó được thêm vào được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng, và dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt tách ra bằng cách sử dụng giá nam châm. Sau khi lặp lại hai lần quy trình này, dung dịch thể thực khuẩn đã rửa giải được trộn lẫn. Nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL trypsin được bổ sung vào dung dịch thể thực khuẩn đã thu hồi. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được bổ sung vào 20 mL chủng *E. coli* ER2738 trong pha sinh trưởng log (OD₆₀₀ 0.4-0.7). *E. coli* được gây nhiễm với các thể thực khuẩn bằng cách nuôi cấy *E. coli* trong một giờ ở 37°C kèm khuấy. *E. coli* được cấy trong đĩa 225 mm x 225 mm. *E. coli* được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015046554A1) hoặc M13KO7ΔpIII (còn gọi là hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C; và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt. Ở điều kiện 1, quy trình này được lặp lại ba lần. Ở điều kiện 2, sau khi quy trình nêu trên được thực hiện một lần, ATP được thay đổi thành AMP và quy trình nêu trên được thực hiện lại (Vòng 2), và sau đó quy trình nêu trên được thực hiện lại bằng ATP (Vòng 3).

Mặt khác, ở điều kiện 3, sau khi quy trình nêu trên được thực hiện một lần, việc lựa chọn vòng đôi được thực hiện ở vòng 2 và vòng 3. Cụ thể là, đầu tiên dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị được bổ sung hCD137-Fc được biotin hóa và nồng độ cuối cùng là 1 mM AMP, và phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Các hạt nam châm phong bế được bổ sung vào dung dịch phản ứng của thể thực

khuẩn và kháng nguyên, và chúng được phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Các hạt được rửa hai lần hoặc ba lần bằng hệ đệm TBS/0,1% Tween20 chứa 1 mM AMP, và một hoặc hai lần bằng TBS chứa 1 mM AMP. Các hạt mà TBS sau đó được thêm vào được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng, và dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt tách ra bằng cách sử dụng giá nam châm. Sau khi lặp lại hai lần quy trình này, dung dịch thể thực khuẩn đã rửa giải được trộn lẫn. Ngoài ra, dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã thu hồi sau đó được bổ sung hCD137-Fc được biotin hóa và nồng độ cuối cùng là 1 mM ATP và phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Các hạt nam châm phong bế được bổ sung vào dung dịch phản ứng của thể thực khuẩn và kháng nguyên, và chúng được phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Các hạt được rửa hai lần hoặc ba lần bằng hệ đệm TBS/0,1% Tween20 chứa 1 mM ATP, và một hoặc hai lần bằng TBS chứa 1 mM ATP. Các hạt mà TBS sau đó được thêm vào được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng, và dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt tách ra bằng cách sử dụng giá nam châm. Sau khi lặp lại hai lần quy trình này, dung dịch thể thực khuẩn đã rửa giải được trộn lẫn. Nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL trypsin được bổ sung vào dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi. Các thể thực khuẩn đã thu hồi được bổ sung vào 20 mL chủng *E. coli* ER2738 trong pha sinh trưởng log (OD₆₀₀ 0.4-0.7). *E. coli* được gây nhiễm với các thể thực khuẩn bằng cách nuôi cấy *E. coli* trong một giờ ở 37°C kèm khuấy. *E. coli* được cấy trong đĩa 225 mm x 225 mm. *E. coli* được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015046554A1) hoặc M13KO7ΔpIII (còn gọi là hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C; và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt.

(9-2) Đánh giá hoạt tính liên kết khi có và không có mặt ATP hoặc AMP bằng ELISA thể thực khuẩn

Từ các khuẩn lạc đơn lẻ của *E. coli* thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy chứa thực khuẩn được thu thập bằng phương pháp thông thường (Methods Mol. Biol. (2002) 178,133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) được sử dụng để siêu lọc chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được. Dòng chảy qua được loại bỏ bằng cách ly tâm (4500 g, 45 phút) NucleoFast 96 trong đó 100 µL chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng trong mỗi giếng. NucleoFast 96, trong đó 100 µL H₂O được bổ sung vào mỗi giếng, được rửa lại bằng cách ly tâm (4500 g, 30 phút). Cuối cùng, 100 µL TBS được bổ

sung, và dung dịch thể thực khuẩn có trong các chất nổi bề mặt trong các giếng NucleoFast 96, mà được để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, được thu hồi.

TBS, 1 mM AMP/TBS hoặc 1 mM ATP/TBS được bổ sung vào các thể thực khuẩn được tinh chế mà sau đó được đưa vào ELISA theo quy trình dưới đây. Các đĩa vi thể được phủ Streptavidin 384 giếng (greiner, 781990) được phủ qua đêm bằng 100 μ L TBS chứa hCD137-Fc được biotin hóa đã điều chế trong Ví dụ 1. Sau khi các kháng nguyên không liên kết được loại bỏ khỏi các đĩa bằng cách rửa mỗi giếng của đĩa bằng TBST, các giếng được phong bế bằng 250 μ L 0,4% Block Ace, 1% BSA, 0,02% Tween, 0,05% ProClin 300-TBS trong một giờ hoặc lâu hơn. Các thể thực khuẩn trình diện kháng thể sau đó cho phép liên kết với kháng nguyên có trong mỗi giếng khi không có và có mặt ATP hoặc AMP bằng cách giữ các đĩa với các thể thực khuẩn tinh chế đã chuẩn bị được bổ sung vào mỗi giếng ở 37°C trong một giờ. Mỗi giếng được rửa bằng TBST, 1 mM ATP/TBST hoặc 1 mM AMP/TBST, và được bổ sung kháng thể kháng M13 tiếp hợp với HRP (Amersham Pharmacia Biotech) được pha loãng trong TBS, 1 mM AMP/TBS hoặc 1 mM ATP/TBS và ủ trong một giờ. Sau khi rửa bằng TBST, 1 mM ATP/TBST hoặc 1 mM AMP/TBST, quá trình hiện màu của dung dịch trong mỗi giếng mà tại đó dung dịch đơn TMB (ZYMED) được bổ sung vào được dừng bằng cách bổ sung axit sulfuric, và sau đó quá trình hiện màu được đo bằng độ hấp thụ ở 450 nm.

Các kết quả ELISA thể thực khuẩn được thể hiện trong Bảng 60.

Ở đây, các dòng vô tính có tỷ lệ hấp thụ S/N cao hơn 2 khi có mặt ATP (tỷ lệ hấp thụ khi có mặt kháng nguyên so với khi không có kháng nguyên) được đánh giá là dương tính để liên kết, và các dòng vô tính có tỷ lệ hấp thụ là 3 hoặc cao hơn khi có mặt/không có mặt ATP hoặc AMP được đánh giá là các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào ATP hoặc AMP (các dòng vô tính chuyển). Kết quả là, đối với hCD137-Fc, hầu hết các dòng vô tính thu được từ điều kiện 1 thể hiện khả năng liên kết khi có mặt ATP nhưng không thể hiện khả năng liên kết khi có mặt AMP. Trong số các dòng vô tính mà thể hiện khả năng liên kết khi có mặt ATP và không liên kết khi không có ATP thu được từ điều kiện 2, có nhiều kháng thể thể hiện khả năng liên kết ngay cả khi có mặt AMP, nhưng tỷ lệ phần trăm là 50% hoặc thấp hơn. Mặt khác, ở điều kiện 3, trong đó việc lựa chọn vòng đôi được thực hiện, 65% trở lên dòng vô tính thể hiện khả năng liên kết khi có

mặt ATP và không liên kết khi không có ATP là có thể thể hiện khả năng liên kết khi có mặt AMP.

Đối với các dòng vô tính thu được, các gen chuỗi nặng được khuếch đại được giải trình tự bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu, pBAD-F, G1seq-R.

Kết quả là, ở điều kiện 3 trong đó việc lựa chọn vòng đôi được thực hiện, các trình tự chuỗi nặng của kháng thể thu được thể hiện khả năng liên kết với CD137 của người phụ thuộc vào cả ATP và AMP là lớn hơn ba lần so với điều kiện 1 mà được thực hiện chỉ với ATP, và lớn hơn khoảng 1,5 lần so với điều kiện 2 mà sử dụng ATP và AMP thay thế cho nhau. Điều này chỉ ra rằng việc lựa chọn vòng đôi là cách tiếp cận có giá trị hơn trong việc thu được các kháng thể mà bộ lọc hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nhiều phân tử nhỏ riêng biệt.

Bảng 60

	Điều kiện 1	Điều kiện 2	Điều kiện 3
Số lượng dòng vô tính đưa vào ELISA	96	96	96
Số lượng dòng vô tính dương (tỷ lệ S/N > 2, ATP)	69	88	91
Số lượng dòng vô tính chuyển ATP (tỷ lệ ATP+/- >= 3)	65	84	82
Số lượng dòng vô tính chuyển ATP, AMP (Tỷ lệ ATP+/- >= 3 và tỷ lệ AMP+/- >= 3)	13	40	54
Tỷ lệ các dòng vô tính chuyển ATP, AMP	20,0%	47,6%	65,9%
Số lượng trình tự dòng vô tính chuyển ATP, AMP (Tỷ lệ ATP+/- >= 3 và tỷ lệ AMP+/- >= 3)	13	25	38

Ví dụ 10: Thu thập các kháng thể liên kết với kháng thể kháng CTLA4 của chuột phụ thuộc ATP từ thư viện chưa qua xử lý

(10-1) Thu thập các kháng thể liên kết với CTLA4 của chuột khi có mặt phân tử nhỏ từ thư viện kháng thể người chưa qua xử lý bằng cách phân tích trọng lượng hạt

Thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể người bao gồm nhiều thể thực khuẩn trình diện miền Fab của các trình tự kháng thể người khác nhau được tạo

thành theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sử dụng poly(A) ARN được tạo thành từ PBMC của người, poly(A) ARN có sẵn trên thị trường hoặc chẳng hạn như khuôn.

Từ thư viện hiển thị thể thực khuẩn kháng thể người chưa qua xử lý được tạo thành, các kháng thể thể hiện hoạt tính liên kết với miền ngoại bào CTLA4 của chuột (mCTLA4) khi có mặt phân tử nhỏ được sàng lọc. Nghĩa là, các thể thực khuẩn trình diện kháng thể bộc lộ hoạt tính liên kết với mCTLA4 bị bắt giữ bởi các hạt khi có mặt phân tử nhỏ được thu thập. Các thể thực khuẩn được thu hồi từ dịch rửa giải thể thực khuẩn được rửa giải khỏi các hạt khi không có phân tử nhỏ. mCTLA4 được biotin hóa (mCTLA4-His-Biotin) được sử dụng làm kháng nguyên trong phương pháp này. mCTLA4-His-Biotin thu được từ quá trình biotin hóa (PIERCE Cat. No. 21329) của mCTLA4-His (Sino Biologics Inc. 50503-M08H, số đăng ký NP_033973.2) bằng phương pháp ghép cặp amin, được tạo ra bằng cách dung hợp đuôi His với miền ngoại bào của mCTLA4.

Các thể thực khuẩn được tạo ra từ *E. coli* mang phagemid hiển thị thể thực khuẩn được tạo thành được tinh chế bằng các phương pháp chung. Dung dịch thư viện thể thực khuẩn sau đó được thẩm tách bằng TBS và thu thập. Quá trình phân tích trọng lượng với kháng nguyên được giữ cố định trên các hạt nam châm được thực hiện. Đối với các hạt nam châm, các hạt được phủ NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads phủ NeutrAvidin) hoặc các hạt được phủ Streptavidin (Dynabeads M-280 Streptavidin) được sử dụng.

Để thu thập một cách hiệu quả các kháng thể chuyển phân tử nhỏ phụ thuộc vào phân tử nhỏ mà có thể đóng vai trò chuyển trong các mô ung thư, việc phân tích trọng lượng để làm giàu các kháng thể liên kết với kháng nguyên khi có mặt adenosin triphosphat (adenosin 5'-triphosphat; ATP) và các chất chuyển hóa ATP, và không liên kết với kháng nguyên khi không có ATP được thực hiện dựa vào phương pháp được mô tả trong patent WO2013/180200 trước đó.

Cụ thể là, dung dịch thư viện thể thực khuẩn đã chuẩn bị được bổ sung mCTLA4 được biotin hóa và ATP và các chất chuyển hóa ATP ở nồng độ cuối cùng là 1 mM và phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Các hạt nam châm phong bế được bổ sung vào dung dịch phản ứng của thể thực khuẩn và kháng nguyên, và chúng được phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Các hạt được rửa

hai lần hoặc ba lần bằng hệ đệm TBS/0,1% Tween20 chứa 1 mM ATP, và một hoặc hai lần bằng TBS chứa 1 mM ATP. Các hạt mà TBS sau đó được thêm vào được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng, và dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt được tách ra bằng cách sử dụng giá nam châm. Sau đó, các hạt được bổ sung vào với nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL trypsin ở vòng 1 và với TBS ở vòng 2 và trở đi, và chúng được tạo huyền phù ở nhiệt độ phòng; và các dung dịch thể thực khuẩn được thu hồi từ các hạt được tách ra bằng cách sử dụng giá nam châm. Nếu TBS được sử dụng, quy trình này được lặp lại hai lần, sau đó là trộn dung dịch thể thực khuẩn đã rửa giải và bổ sung nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL trypsin vào dung dịch thể thực khuẩn đã thu hồi. Các thực khuẩn đã thu hồi được bổ sung vào 10 mL chủng *E. coli* ER2738 trong pha sinh trưởng log (OD₆₀₀ 0.4-0.7). *E. coli* được gây nhiễm với các thể thực khuẩn bằng cách nuôi cấy *E. coli* trong một giờ ở 37°C kèm khuấy. *E. coli* được cấy trong đĩa 225 mm x 225 mm. *E. coli* được gây nhiễm M13KO7TC (WO2015046554A1) hoặc M13KO7ΔpIII (còn gọi là hyperphage) (PROGEN Biotechnik), và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C; và các thể thực khuẩn được thu hồi từ các chất nổi bề mặt. Trong khi nuôi cấy, điều kiện để bổ sung 100μM IPTG và điều kiện để không bổ sung IPTG được sử dụng để gây ra biểu hiện của các gen Fab từ trình tự khởi đầu lac. Quy trình này được lặp lại bốn lần.

(10-2) Đánh giá hoạt tính liên kết khi có và không có mặt phân tử nhỏ bằng ELISA thể thực khuẩn

Từ các khuẩn lạc đơn lẻ của *E. coli* thu được trong Ví dụ 10-1, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy chứa thể thực khuẩn được thu thập bằng phương pháp thông thường (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) được sử dụng để siêu lọc chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được. 100 μL mỗi chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được dùng cho mỗi giếng NucleoFast 96 và ly tâm ở 4500 g trong 45 phút được thực hiện để loại bỏ dòng chảy qua. 100 μL H₂O được bổ sung và rửa bằng cách ly tâm (4500 g, 30 phút) được thực hiện lại. Cuối cùng, 100 μL TBS được bổ sung, để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, và dung dịch thể thực khuẩn có trong các chất nổi bề mặt được thu hồi.

TBS được bổ sung vào các thể thực khuẩn đã tinh chế mà sau đó được đưa vào ELISA theo quy trình dưới đây. Các đĩa microtiter StreptaWell 96 (Roche)

được phủ qua đêm bằng 100 μL TBS chứa mCTLA4-His-Biotin. Sau khi mCTLA4-His-Biotin không liên kết được loại bỏ khỏi các đĩa bằng cách rửa mỗi giếng của đĩa bằng TBST, các giếng được phong bế bằng 250 μL 2% sữa tách béo-TBS trong hơn một giờ. Các thể thực khuẩn trình diện kháng thể sau đó được cho phép liên kết với mCTLA4-His-Biotin có trong mỗi giếng khi không có và có mặt ATP bằng cách loại bỏ 2% sữa tách béo-TBS, sau đó giữ các đĩa với các thể thực khuẩn tinh chế đã chuẩn bị được bổ sung vào mỗi giếng ở nhiệt độ phòng trong một giờ. Mỗi giếng được rửa bằng TBST hoặc ATP/TBST, và được bổ sung kháng thể kháng M13 tiếp hợp với HRP (Amersham Pharmacia Biotech) được pha loãng trong TBS hoặc ATP/TBS và ủ trong một giờ. Sau khi rửa bằng TBST hoặc ATP/TBST, quá trình hiện màu của dung dịch trong mỗi giếng mà dung dịch đơn TMB (ZYMED) được bổ sung vào được dừng bằng cách bổ sung axit sulfuric, và sau đó quá trình hiện màu được đo bằng độ hấp thụ ở 450 nm. Kết quả là, một số kháng thể liên kết với mCTLA4 chỉ khi có mặt ATP được xác nhận.

Các kết quả ELISA thể thực khuẩn được thể hiện trong Bảng 61.

Ở đây, các dòng vô tính có độ hấp thụ cao hơn 0,2 khi có mặt ATP được đánh giá là dương tính, và các dòng vô tính có tỷ lệ hấp thụ cao hơn 2 khi có mặt/không có mặt ATP được đánh giá là các dòng vô tính có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP (các dòng vô tính chuyển).

Bảng 61

Thể thực khuẩn phụ được sử dụng trong quá trình phân tích trọng lượng	M13KO7TC	M13KO7TC	M13KO7 Δ pIII
Nồng độ IPTG khi nuôi cấy để phân tích trọng lượng	0 μM	100 μM	0 μM
Số lượng dòng vô tính đưa vào ELISA	96	96	96
Số lượng dòng vô tính dương (độ hấp thụ > 0,2)	20	41	62
Số lượng dòng vô tính chuyển (tỷ lệ SM+/- > 2)	0	12	16

Sáng chế nêu trên được mô tả chi tiết bằng các ví dụ và minh họa nhằm mục đích hỗ trợ để hiểu rõ và phần mô tả và minh họa ở đây không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Tất cả các tiết lộ về sáng chế và tài liệu khoa học được trích dẫn ở đây đều được kết hợp một cách rõ ràng bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 11: Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP và ADP *in vitro* của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến bằng cách sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị 4-1BB Jurkat

Dòng tế bào GloResponse™ NF-κB Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004) được sử dụng cho phép đo hoạt tính *in vitro* của các biến thể được tạo ra trong Ví dụ 7-5 (Bảng 52). Bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 384 giếng, 10 µL tế bào FcγRIIB CHO-K1 (Promega) được điều chế ở nồng độ 4×10^5 /mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS). Sau đó, 10 µL dung dịch kháng thể chứa ADP, hoặc dung dịch kháng thể chứa ATP, hoặc dung dịch kháng thể không chứa ATP hoặc ADP, được bổ sung vào mỗi giếng. Sau đó, 10 µL dòng tế bào GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chế đến nồng độ 2×10^6 /mL bằng môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Nồng độ cuối cùng của ADP là 10 µM; và nồng độ cuối cùng của ATP là 10 µM. Các đĩa được để yên trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂ và 15 phút ở nhiệt độ phòng; và 30 µL thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, lượng phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang của giếng không thêm kháng thể được xác định là “đơn vị sáng tương đối” (số lần cảm ứng) và đóng vai trò là chỉ số đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 58. Từ Fig. 58, được xác nhận là A375-P587/B167-LamLib, A551-P587/B256-LamLib, A551-P587/B379-LamLib, A375-SCF041aPh/B167-LamLib, A551-SCF041aPh/B256-LamLib, A551-SCF041aPh/B379-LamLib, A375-SCF043aPh/B167-LamLib, A551-SCF043aPh/B256-LamLib, A551-SCF043aPh/B379-LamLib, A375-SCF057aPh/B167-LamLib, A551-SCF057aPh/B256-LamLib, và A551-SCF057aPh/B379-LamLib thể hiện hoạt tính chủ vận CD137 của người theo cách

phụ thuộc ATP và AMP.

Ví dụ 12: Phép đo mức độ ATP ngoại bào trong các vị trí khối u

Kháng thể chuyển ATP liên kết với phân tử đích khi có mặt ATP và bộc lộ hiệu lực của thuốc. Việc đánh giá mức độ ATP ngoại bào trong các vị trí mô khối u được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11. Các tế bào được tạo ra bằng ProbeX sử dụng kỹ thuật phân tách luciferaza của công ty. Các tế bào biểu hiện protein tận cùng C luciferaza được liên kết với thụ thể purinergic P2Y11 (số đăng ký AF030335) với ATP làm phối tử, và protein tận cùng N luciferaza được liên kết với β -arrestin-2 isoform 1 (số đăng ký NM_004313). Luciferaza hoạt động được tạo ra bởi sự liên kết của hai đoạn luciferaza có mặt riêng biệt trong tế bào bằng cách kích thích ATP, và sự phát quang sử dụng luciferin làm chất nền có thể thu được.

(12-1) Độ đáp ứng ATP của các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11

Các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 được nuôi cấy và duy trì trong môi trường của Eagle được cải biến của Dulbecco (Glucose trung bình - cao của Eagle được cải biến của Dulbecco: D5796/Sigma-Aldrich) chứa 10% huyết tương bào thai bò, 0,8 mg/mL G418 (GeneticinTM), và 0,05 mg/mL phleomycin D1 (ZeocinTM) để truyền qua. Các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 được đặt trong khay vi thể microplate 96 giếng (μ CLEARTM, WHITE, CELLTARTM/Greiner Bio-One) ở mật độ 30000 tế bào/giếng, được nuôi cấy qua đêm, và sau đó dung dịch nuôi cấy được loại bỏ khỏi mỗi giếng và được thay thế bằng 0,18 mL dung dịch nuôi cấy chứa 0,5 mg/mL luciferin (VivoGloTM Luciferin, In Vivo Grade /Promega). Để đạt được các nồng độ cuối cùng là 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, và 2,0 mM, 0,02 mL adenosin, AMP, ADP, hoặc dung dịch ATP được bổ sung, và các giá trị phát quang được đo trên thiết bị đọc đĩa EnVision (Perkin Elmer) sau 30 phút ủ trong thiết bị ủ CO₂ (37°C, 5% CO₂).

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 59. Các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 làm tăng độ phát quang của chúng theo cách đặc hiệu ATP phụ thuộc vào nồng độ phối tử.

(12-2) Đánh giá nồng độ ATP ngoại bào trong các vị trí mô khối u

Các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 được tách ra từ các bình nuôi cấy bằng hệ đệm phân ly tế bào, không có enzym, và PBS (Thermo Fisher Scientific), được rửa bằng HBSS, và sau đó được tạo thành huyền phù tế bào HBSS, được sử dụng để đo mức độ ATP ngoại bào *in vivo*.

(12-2-1) Sự tạo thành đường cong chuẩn ATP *in vivo*

0,2 mL huyền phù tế bào chứa nồng độ cố định của ATP, 1 mg/mL luciferin (VivoGlo, Promega), và $1,0 \times 10^7$ tế bào/mL của các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 được cấy dưới da trong vùng bụng của chuột C3H/HeN, và 20 phút sau, các phép đo hình ảnh phát quang được thực hiện trong điều kiện gây mê isoflurane với thiết bị hình ảnh *in vivo*, CT phổ IVIS. Các hình ảnh thu được đã được phân tích bằng Phần mềm Hình ảnh Sống, và một đường chuẩn ATP trong điều kiện đo *in vivo* được chuẩn bị từ các giá trị phát quang được tính toán và nồng độ của ATP được thêm vào.

Fig. 60 thể hiện các kết quả. Các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 bộc lộ sự phát quang phụ thuộc vào nồng độ ATP ngay cả ở các điều kiện *in vivo* khi được cấy dưới da vào chuột C3H/HeN, có thể được tạo ra trong đường cong chuẩn để đánh giá mức độ ATP *in vivo*.

(12-2-2) Đánh giá mức độ ATP ngoại bào trong các vị trí mô khối u

0,2 mL huyền phù tế bào chứa 1 mg/mL luciferin (VivoGlo, Promega) và $1,0 \times 10^7$ tế bào/mL của các tế bào Luc/HEK293 phân tách P2Y11 được cấy dưới da vào vị trí khối u của chuột mang khối u FM3A (thể tích khối u 200-300 mm³) và các phép đo hình ảnh phát quang được thực hiện 20 phút sau đó trong điều kiện gây mê isoflurane bằng thiết bị hình ảnh *in vivo*, CT phổ IVIS. Các hình ảnh thu được được phân tích bằng Phần mềm Hình ảnh Sống, mức ATP được tính toán từ giá trị phát quang của vị trí khối u bằng cách sử dụng đường cong chuẩn ATP *in vivo*, và điều này được đặt làm mức ATP ngoại bào tại vị trí khối u.

Các kết quả của phép đo hình ảnh phát quang được thể hiện trên Fig. 61 và mức độ ATP ngoại bào tại vị trí khối u, được tính toán từ đường cong chuẩn của ATP, được thể hiện trong Bảng 62. Mức độ phát quang tại vị trí mô khối u (chuột mang khối u FM3A) là cao hơn mức độ phát quang tại nền (vị trí bình thường), và

mức độ ATP ngoại bào tại vị trí mô khối u ở mô hình cấy ghép FM3A được tính là trung bình bằng 1,31 mM trên đường chuẩn ATP *in vivo* đã chuẩn bị.

Bảng 62

Chuột mang khối u FM3A	1	2	3	Trung bình $\pm$ SD
ATP ngoại bào (mM)	0,81	1,26	1,86	1,31 $\pm$ 0,53

Ví dụ 13: Hoạt tính kháng u phụ thuộc ATP của kháng thể kháng hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

(13-1) Điều chế kháng thể kháng hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

Bằng cách tham chiếu tới các phương pháp được mô tả trong WO2015/083764 và WO2013/180200, các kháng thể thu được được tối ưu hóa để tạo ra các kháng thể thụ thể kháng interleukin 6 của người (hIL6R) có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết hợp như được thể hiện trong Bảng 63 để biểu hiện và tinh chế các kháng thể kháng hIL6R theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể

Bảng 63

Tên kháng thể	VH	CH	VL	CL
MRAH-G4T1/ MRAL-k0	MRAH SEQ ID NO: 190	G4T1 SEQ ID NO: 198	MRAL SEQ ID NO: 191	k0 SEQ ID NO: 199
H0002-G4T1/ L1058-lam1	H0002 SEQ ID NO: 192		L1058 SEQ ID NO: 193	lam1 SEQ ID NO: 189
H0041-G4T1/ L1088-lam1	H0041 SEQ ID NO: 194		L1088 SEQ ID NO: 195	
H0052-G4T1/ L1083-lam1	H0052 SEQ ID NO: 196		L1083 SEQ ID NO: 197	

hIL6R (SEQ ID NO: 200) được tổng hợp di truyền làm kháng nguyên và cài xen vào plasmid để biểu hiện ở động vật, và sau đó nó được đưa vào các tế bào CHO, và do đó, dòng biểu hiện ổn định (hIL6R-CHO) biểu hiện kháng nguyên chủ yếu được nhân bản. Protein kháng nguyên được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp dưới đây. Dòng hIL6R-CHO được tạo huyền phù ở mật độ tế bào thích hợp, được gieo và nuôi cấy trong các bình, và kháng nguyên được tinh chế từ chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quang phổ kế được sử dụng để đo độ hấp thụ ở 280 nm của các dung dịch kháng nguyên đã tinh chế. Các nồng độ của kháng nguyên đã tinh chế được tính từ các giá trị đo thu được sử dụng hệ số hấp thụ được tính toán bằng phương pháp PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(13-2) Tính toán các giá trị KD phụ thuộc nồng độ ATP của các kháng thể kháng hIL6R

Việc phân tích ái lực đối với hIL6R khi có mặt mỗi nồng độ ATP là 0, 1, 10, và 100 μM được thực hiện trên Biacore T200 sử dụng các kháng thể được mô tả trong Bảng 63. Các phép đo được thực hiện với tốc độ dòng là 10 $\mu\text{L}/\text{phút}$, thời gian tương tác là 1 phút, thời gian phân ly là 1 phút, và động học chu kỳ đơn ở 37°C. Đối với hệ đệm, 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , và 0,05% Tween20, pH 7,4 chứa các nồng độ ATP khác nhau (0, 1, 10, và 100 μM) được sử dụng. Phần mềm đánh giá Biacore đi kèm của Biacore T200 được sử dụng để phân tích, và mô hình liên kết Langmuir 1:1 được sử dụng cho mô hình phù hợp. Các kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 64 và Fig. 62.

Tính toán các giá trị KD phụ thuộc nồng độ ATP (M) của các kháng thể kháng hIL6R

Bảng 64

Tên kháng thể		Nồng độ ATP (μM)			
		0	1	10	100
MRAH-G4T1/ MRAL-k0	Trung bình SD	1,70E-08	1,88E-08	1,79E-08	1,80E-08
		3,81E-09	4,07E-09	4,08E-09	4,00E-09
H0002-G4T1/	Trung bình	N.A.*	N.A.*	N.A.*	1,16E-06

L1058-lam1	SD	N.A.*	N.A.*	N.A.*	4,23E-07
H0041-G4T1/ L1088-lam1	Trung bình SD	N.A.* N.A.*	2,38E-06 6,00E-07	3,20E-07 7,45E-08	4,83E-08 1,16E-08
H0052-G4T1/ L1083-lam1	Trung bình SD	N.A.* N.A.*	1,45E-06 1,17E-06	5,05E-08 1,41E-08	8,31E-09 2,84E-09

* Các mẫu có chú thích “Các hằng số động học không thể được xác định duy nhất” trong phân tích Biacore được coi là Bị từ chối và kết quả được hiển thị là “N.A.”

Các kết quả này thể hiện rằng KD đối với hIL6R của MRAH-G4T1/MRAL-k0 không bị ảnh hưởng bởi nồng độ ATP trong thử nghiệm, nhưng KD đối với hIL6R của H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1 trở nên nhỏ hơn với nồng độ cao hơn của ATP trong thử nghiệm. Tức là, nồng độ ATP trong thử nghiệm càng cao thì hoạt tính liên kết càng mạnh. Các kết quả này đã xác nhận rằng H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1 có hoạt tính liên kết với hIL6R phụ thuộc ATP.

Sau đây, kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên không phụ thuộc vào nồng độ ATP, chẳng hạn như MRAH-G4T1/MRAL-k0, có thể được đề cập đến là kháng thể không chuyên, và kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào nồng độ ATP, chẳng hạn như H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1, có thể được đề cập đến là kháng thể chuyên.

(13-3) Tính toán các giá trị KD phụ thuộc nồng độ ADP và ATP của các kháng thể kháng hIL6R

Các kháng thể được mô tả trong Bảng 63 sau đó được sử dụng để thực hiện việc phân tích ái lực hIL6R khi có mặt 10 và 100 μ M ADP hoặc AMP thay vì ATP bằng cách sử dụng Biacore T200 theo các điều kiện được mô tả ở trên. Các kết quả phân tích của phép đo sử dụng ADP được thể hiện trong Bảng 65 và Fig. 63, và các kết quả phân tích của phép đo sử dụng AMP được thể hiện trong Bảng 66 và Fig. 64. Các kháng thể có đáp ứng 10 RU hoặc thấp hơn tại thời điểm đo được xem xét là không thể phân tích được và được ký hiệu là N.D.

Tính toán các giá trị KD phụ thuộc nồng độ ADP (M) của các kháng thể kháng hIL6R

Bảng 65

Tên kháng thể	Nồng độ ADP (μM)	
	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-lam1	5,64E-09	5,96E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	N.D.	N.D.
H0041-G4T1/L1088-lam1	1,03E-05	2,96E-07
H0052-G4T1/L1083-lam1	5,81E-08	1,01E-08

Tính toán các giá trị KD phụ thuộc nồng độ AMP (M) của các kháng thể kháng hIL6R

Bảng 66

Tên kháng thể	Nồng độ AMP (μM)	
	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-lam1	5,33E-09	5,46E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	N.D.	N.D.
H0041-G4T1/L1088-lam1	N.D.	1,81E-06
H0052-G4T1/L1083-lam1	6,64E-06	1,18E-07

Các kết quả này thể hiện rằng KD đối với hIL6R của MRAH-G4T1/MRAL-k0 không bị ảnh hưởng bởi nồng độ của ADP và AMP trong thử nghiệm, nhưng tương tự với trường hợp của ATP, nồng độ ADP hoặc AMP cao hơn trong thử nghiệm đi kèm với KD nhỏ hơn đối với hIL6R của H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1, tức là, hoạt tính liên kết mạnh hơn. Các kết quả này đã xác nhận rằng H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1, và H0052-G4T1/L1083-lam1 có hoạt tính liên kết phụ thuộc ADP hoặc AMP đối với hIL6R.

(13-4) Đánh giá hoạt tính ADCC phụ thuộc nồng độ ATP của các kháng thể kháng hIL6R

Các kháng thể được điều chế theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như trong Bảng 67 bằng cách thay đổi các vùng hằng định chuỗi nặng của các kháng thể được lưu ý ở trên với mFa55 (SEQ ID NO: 184), trong đó hoạt tính ADCC được tăng cường bằng cách bổ sung các cải biến tăng cường khả năng liên kết Fc γ RIV với mIgG2a, và bằng cách thay đổi vùng hằng định chuỗi nhẹ từ người sang chuột. Ngoài ra, KLH-mFa55 (IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1) được chuẩn bị làm đối chứng âm.

Các tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể

Bảng 67

Tên kháng thể	VH	CH	VL	CL
IC17HdK-mFa55/ IC17L-mk1	IC17HdK SEQ ID NO: 187	mFa55 SEQ ID NO: 184	IC17L SEQ ID NO: 188	mk1 SEQ ID NO: 185
MRAH-mFa55/ MRAL-mk0	MRAH SEQ ID NO: 190		MRAL SEQ ID NO: 191	mk0 SEQ ID NO: 211
H0002-mFa55/ L1058-ml0	H0002 SEQ ID NO: 192		L1058 SEQ ID NO: 193	ml0 SEQ ID NO: 212
H0041-mFa55/ L1088-ml0	H0041 SEQ ID NO: 194		L1088 SEQ ID NO: 195	
H0052-mFa55/ L1083-ml0	H0052 SEQ ID NO: 196		L1083 SEQ ID NO: 197	

Các kháng thể này được sử dụng để đánh giá ADCC kháng lại Hepa1-6 (hIL6R-Hepa1-6), dòng ung thư gan chuột biểu hiện hIL6R có độ dài đầy đủ (SEQ ID NO: 213) như được điều chế bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, theo phương pháp dưới đây.

Thử nghiệm sinh học chỉ thị mFc γ RIV ADCC, Core Kit (Promega) được sử dụng cho các phép đo dưới đây. Mỗi giếng của đĩa 96 giếng được bổ sung 100 μ L hIL6R-Hepa1-6 đã điều chế trong môi trường ở nồng độ 2×10^5 /mL, và đĩa được để yên ở 37°C trong 21 giờ. Đối với môi trường nuôi cấy, 90% DMEM, 10% FBS, 600

μg Geneticin, và 500 μg Zeocin được sử dụng. Sau khi đĩa được ly tâm trong năm phút ở 200xg, 4°C, chất nổi bề mặt của mỗi giếng được hút ra. Dung dịch của các kháng thể được mô tả trong Bảng 67 được pha loãng trong hệ đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dung dịch ATP được pha loãng trong hệ đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 0, 1, 10, và 100 μM , và 25 μL dung dịch được điều chế bằng cách bổ sung 0,69 mL tế bào phụ trợ hiệu ứng được cung cấp trong bộ kit vào 3,82 mL hệ đệm thử nghiệm được trộn đến tổng cộng 75 μL , và các hỗn hợp này được bổ sung vào mỗi giếng và để yên ở 37°C trong sáu giờ. Đối với hệ đệm thử nghiệm, 1,5 mL huyết thanh IgG thấp phụ trợ có trong bộ kit được bổ sung vào 36 mL RPMI 1640 và sử dụng. Đĩa sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và 75 μL thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang trong giếng không được bổ sung kháng thể là số lần cảm ứng, và đóng vai trò làm chỉ số đánh giá hoạt tính của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 65. Trong hình, số lần cảm ứng được biểu thị là đơn vị sáng tương đối (RLU).

Các kết quả này thể hiện rằng ADCC của MRAH-mFa55/MRAL-mk0, kháng thể không chuyển, đối với các tế bào biểu hiện hIL6R là không bị ảnh hưởng bởi nồng độ ATP trong thử nghiệm, nhưng ADCC của các kháng thể chuyển H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 sẽ mạnh hơn với nồng độ ATP cao hơn trong thử nghiệm. Các kết quả này đã xác nhận rằng H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc ATP đối với hIL6R.

(13-5) Đánh giá hoạt tính kháng u *in vivo* của các kháng thể kháng hIL6R

Vì ADCC của mỗi kháng thể được xác nhận, một thử nghiệm được tiến hành để đánh giá hoạt tính kháng u *in vivo* của các kháng thể này bằng cách sử dụng mô hình chuột mang khối u của chuột C57BL/6 với hIL6R-Hepa1-6 theo phương pháp dưới đây.

Kháng thể kháng asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries) được hòa tan trong 1 mL nước cất (Otsuka Pharmaceutical Factory) và sau đó được pha loãng

bằng 4 mL PBS. Kháng thể kháng asialo GM1 được điều chế theo cách này được sử dụng trong màng bụng cho 100 con chuột C57BL/6 ở liều 0,1 mL mỗi con chuột. Một ngày sau, dung dịch trộn được điều chế trong đó cùng một thể tích chất nền Matrigel (Corning) được bổ sung vào huyền phù tế bào của hIL6R-Hepa1-6 được tạo huyền phù tới $1 \times 10^8/\text{mL}$ trong dung dịch muối Hanks' Balanced (Sigma). Dung dịch trộn này được tiêm dưới da vào 100 con chuột C57BL/6 ở liều 0,2 mL mỗi con chuột, và các tế bào được cấy ghép. Đường kính khối u của chuột được đo bằng thước kẹp, và thể tích khối u được xác định bằng (trục lớn) $\times$ (trục nhỏ) $\times$ (trục nhỏ) $\times$ (1/2). Phép đo đường kính khối u được thực hiện bởi cá thể không biết thành phần của dung dịch thuốc được sử dụng cho mỗi con chuột. Các đường kính khối u và khối lượng cơ thể của 100 con chuột C57BL/6 nêu trên được đo vào ngày thứ 11 sau khi cấy ghép tế bào. Dựa vào giá trị này, thực hiện ngẫu nhiên trên các con chuột, và các con chuột được chia thành tổng cộng 5 nhóm: 4 nhóm mỗi nhóm 10 con và một nhóm 8 con; và mỗi nhóm nhận được dung dịch của các kháng thể được chỉ ra trong Bảng 67 qua tĩnh mạch đuôi. Ở đây, nhóm 8 con nhận H0002-mFa55/L1058-m10. Liều (mL) dung dịch kháng thể được sử dụng là $(0,01 \text{ (mL/g)}) \times$ (khối lượng cơ thể (g) của mỗi con chuột). Các đường kính khối u và khối lượng cơ thể của các con chuột C57BL/6 được phân nhóm ở trên được đo tương tự vào ngày thứ 14, 18, 21, và 25 sau khi cấy ghép. Vào ngày thứ 18 sau khi cấy ghép, các dung dịch kháng thể được thể hiện trong Bảng 67 được sử dụng cho nhóm tương ứng qua tĩnh mạch đuôi ở liều được xác định bởi cùng công thức tính được mô tả ở trên dựa vào dữ liệu khối lượng cơ thể đo được. Thể tích khối u trung bình ở mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể ở mỗi ngày đo được tính toán, và nó đóng vai trò làm chỉ số để đánh giá hoạt tính kháng u *in vivo* của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 66.

Trong số các kháng thể chuyển mà ADCC phụ thuộc ATP được xác nhận, H0041-mFa55/L1088-m10 và H0052-mFa55/L1083-m10 được xác nhận là bộc lộ hoạt tính kháng u đối với các tế bào biểu hiện hIL6R với cùng phạm vi của MRAH-mFa55/MRAL-mk0, là kháng thể không chuyển, từ các kết quả trên. Các kết quả này cho thấy rằng ATP ngoại bào trong vùng lân cận của khối u có ở mức nồng độ mà H0041-mFa55/L1088-m10 và H0052-mFa55/L1083-m10 thể hiện chức năng tương tự với MRAH-mFa55/MRAL-mk0.

Ví dụ 14: Đánh giá các tác dụng toàn thân của kháng thể kháng hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

Để đánh giá các tác dụng của kháng thể kháng hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP ở các mô bình thường, chuột bình thường (C57BL/6) và chuột chuyển gen biểu hiện quá mức hIL6R (hIL6R-tgm) một cách hệ thống (Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995 May 23; 92(11):4862-4866) được sử dụng để đánh giá động lực học huyết tương của các kháng thể. Đối với việc đánh giá này, các kháng thể được mô tả trong Bảng 67 được sử dụng cho chuột bình thường (C57BL/6) và hIL6R-tgm, và động lực học huyết tương của chúng được so sánh. Ở hIL6R-tgm, đã được báo cáo rằng các kháng thể thông thường liên kết với hIL6R biến mất qua hIL6R loại màng là kết quả của việc liên kết với hIL6R loại màng được biểu hiện một cách hệ thống (Nature Biotechnology tập 28, trang 1203-1207 (2010)).

2 mg/mL MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, hoặc H0052-mFa55/L1083-ml0 được sử dụng trong tĩnh mạch cho chuột bình thường và hIL6R-tgm ở liều đơn 10 mL/kg. Ở chuột bình thường, máu được thu thập 5 phút, 7, 24, 48, 72, và 168 giờ sau khi sử dụng ở tất cả các nhóm gồm nhóm MRAH-mFa55/MRAL-mk0, nhóm H0002-mFa55/L1058-ml0, nhóm H0041-mFa55/L1088-ml0, và nhóm H0052-mFa55/L1083-ml0. Đối với hIL6R-tgm, máu được thu thập 5 phút, 7, 24, 48, 52, 55, 72, và 168 giờ sau khi sử dụng ở nhóm MRAH-mFa55/MRAL-mk0, và 5 phút, 7, 24, 48, 72, và 168 giờ sau khi sử dụng ở nhóm H0002-mFa55/L1058-ml0, nhóm H0041-mFa55/L1088-ml0, và nhóm H0052-mFa55/L1083-ml0. Máu thu được được ly tâm nhanh chóng ở 4°C, 12000 vòng/phút, 10 phút; và huyết tương được tách ra. Huyết tương được bảo quản trong buồng đông lạnh cài đặt ở nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn đến khi đo.

Nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương được đo bằng phương pháp điện hóa phát quang (ECL). Dung dịch hIL6R được bổ sung vào đĩa MULTI-ARRAY PR (Meso Scale Diagnostics, LLCs), để yên ở 37°C trong một giờ, và hIL6R được giữ cố định trên đĩa. Đối với đường cong chuẩn, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 được điều chế ở các nồng độ huyết tương là 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, và 0,125 µg/mL; và H0002-mFa55/L1058-ml0 được điều chế ở các nồng độ huyết tương là 64, 32, 16, 8, 4, 2, và 1 µg/mL. Sau khi bổ sung dung dịch 1 M Tris-HCl, pH 8,0 chứa 0,05% Tween20 và 1% BSA vào đĩa được cố định hIL6R, mẫu huyết tương được pha

loãng 250 lần trong dung dịch axit axetic 0,3 M, cũng như mẫu đường cong chuẩn được bổ sung vào nhanh chóng, và dung dịch ATP cũng được bổ sung vào và trộn. Sau khi đĩa được để yên trong một giờ ở nhiệt độ phòng, kháng thể kháng IgG của chuột được gắn nhãn biotin (Southern Biotechnology Associates, Inc) được bổ sung và để yên ở nhiệt độ phòng trong một giờ. Sau đó, Streptavidin SULFO-TAG Labeled (Meso Scale Diagnostics, LLC) được bổ sung, để yên ở nhiệt độ phòng trong một giờ, sau đó là bổ sung hệ đệm đọc T (Meso Scale Diagnostics, LLC), và phản ứng được đo bằng thiết bị phát quang điện hóa, SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) được sử dụng để tính toán nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương chuột.

Nồng độ kháng nguyên hòa tan trong huyết tương được đo bằng ECL. Mẫu huyết tương của chuột được pha loãng 50 lần được trộn với kháng thể kháng IL6R của người được gắn nhãn SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, LLC) (R&D Systems), kháng thể kháng IL6R của người được gắn nhãn biotin (R&D Systems), và kháng thể kháng IL6R của người tocilizumab dư (sản phẩm được sản xuất nội bộ), và hỗn hợp được ủ qua đêm ở 37°C. Sau khi hỗn hợp được bổ sung vào đĩa 96 giếng tiêu chuẩn được phủ Streptavidin bị phong bế (Meso Scale Diagnostics, LLC), sau đó là bổ sung hệ đệm đọc, phản ứng được đo trên SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) được sử dụng để tính nồng độ của kháng nguyên hòa tan trong huyết tương chuột.

Các kết quả so sánh mức độ máu của MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 ở chuột bình thường và hIL6R-tgm được thể hiện trên Fig. 67, Fig. 68, Fig. 69, và Fig. 70, tương ứng.

MRAH-mFa55/MRAL-mk0, kháng thể không chuyển, bộc lộ độ thải trừ nhanh hơn ở hIL6R-tgm mà biểu hiện hIL6R một cách hệ thống, so với độ thải trừ ở chuột bình thường (Fig. 67). Kết quả này dường như là do thực tế là kháng thể không chuyển được liên kết với hIL6R loại màng được biểu hiện trong các mô bình thường của toàn bộ cơ thể và biến mất thông qua hIL6R.

Mặt khác, nồng độ kháng thể mất đi nhanh chóng đáng kể không được quan sát thấy đối với các kháng thể chuyển H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 và H0052-mFa55/L1083-ml0 trong hIL6R-tgm, giống như

kháng thể không chuyển, so với kháng thể ở chuột bình thường. Các kết quả này cho thấy rằng trái ngược với kết quả của kháng thể không chuyển, các kháng thể chuyển không liên kết với hIL6R loại màng được biểu hiện một cách hệ thống và chúng không gây ra sự thải trừ qua trung gian hIL6R.

So với các kháng thể chuyển H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0, chỉ có H0052-mFa55/L1083-ml0 thể hiện khả năng liên kết mạnh hơn ở nồng độ ATP thấp dẫn đến sự mất đi nhanh chóng kháng thể trong hIL6R-tgm tương ứng với chuột bình thường.

Các kết quả này cho thấy rằng nồng độ ATP ngoại bào ở các mô bình thường là thấp đối với các kháng thể chuyển để liên kết với hIL6R.

Sau đó, nồng độ huyết tương của hIL6R hòa tan trong hIL6R-tgm được so sánh sau khi các kháng thể tương ứng được sử dụng. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 71.

So với các nồng độ hIL6R hòa tan ở chuột nhận đối chứng isotyp IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, nồng độ hIL6R hòa tan ở chuột nhận kháng thể không chuyển, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, quan sát thấy tích tụ. Điều này được cho là do liên kết của kháng thể không chuyển với dạng hòa tan của hIL6R, ngăn cản các con đường trao đổi chất bình thường.

Mặt khác, không có sự tích tụ kháng nguyên đáng kể như của kháng thể không chuyển được quan sát thấy ở những con chuột nhận kháng thể chuyển H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0. Khi các kháng thể chuyển H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 được so sánh, xu hướng tích tụ kháng nguyên được quan sát thấy đối với các kháng thể cho thấy sự liên kết mạnh hơn ở nồng độ ATP thấp.

Các kết quả này cho thấy rằng nồng độ ATP ngoại bào ở các mô bình thường và máu là thấp đối với các kháng thể chuyển để liên kết với dạng hòa tan và dạng màng của hIL6R.

Ví dụ 15: Đánh giá đồng thời tác dụng kháng u và tác dụng toàn thân của kháng thể kháng hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

Các tác dụng kháng u và các tác dụng toàn thân được đánh giá đồng thời để các tác dụng toàn thân của kháng thể kháng hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP khi có mặt khối u. Đối với đánh giá này, mô hình hIL6R-tgm được cấy hIL6R-Hepa1-6 được sử dụng, và các kháng thể được mô tả trong Bảng 67 được sử dụng.

Kháng thể kháng asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries) được hòa tan trong 1 mL nước cất (Otsuka Pharmaceutical Factory) và sau đó được pha loãng bằng 4 mL PBS. Kháng thể kháng asialo GM1 được điều chế theo cách này được sử dụng trong màng bụng cho 83 con chuột hIL6R-tgm ở liều 0,1 mL mỗi con chuột. Một ngày sau, dung dịch trộn được điều chế trong đó cùng một thể tích chất nền Matrigel (Corning) được bổ sung vào huyền phù tế bào của hIL6R-Hepa1-6 được tạo huyền phù tới 1×10^8 /mL trong dung dịch muối Hanks' Balanced (Sigma). Dung dịch trộn này được tiêm dưới da vào 83 con chuột hIL6R-tgm ở liều 0,2 mL mỗi con chuột, và các tế bào được cấy ghép. Đường kính khối u của chuột được đo bằng thước kẹp, và thể tích khối u được xác định bằng $(\text{trục lớn}) \times (\text{trục nhỏ}) \times (\text{trục nhỏ}) \times (1/2)$. Phép đo đường kính khối u được thực hiện bởi cá thể không biết thành phần của dung dịch thuốc được sử dụng cho mỗi con chuột. Các đường kính khối u và khối lượng cơ thể của 83 con chuột hIL6R-tgm nêu trên được đo vào ngày thứ 10 sau khi cấy ghép tế bào. Dựa vào giá trị này, thực hiện ngẫu nhiên trên các con chuột, và các con chuột được chia thành 4 nhóm mỗi nhóm 10 con, mỗi nhóm nhận dung dịch kháng thể tương ứng theo đường tĩnh mạch đuôi từ bốn trong số các dung dịch kháng thể được thể hiện trong Bảng 67, ngoại trừ H0052-mFa55/L1083-ml0. Liều (mL) dung dịch kháng thể được sử dụng được tính theo công thức $(0,01 \text{ (mL/g)}) \times (\text{khối lượng cơ thể (g) của mỗi con chuột})$. Sau đó, đường kính khối u và khối lượng cơ thể của hIL6R-tgm được phân nhóm nêu trên được đo tương tự vào ngày thứ 13, 17, và 20 sau khi cấy ghép. Vào ngày thứ 17 sau khi cấy ghép, các dung dịch của bốn kháng thể trong số các kháng thể được thể hiện trong Bảng 67, ngoại trừ H0052-mFa55/L1083-ml0, được sử dụng cho các nhóm tương ứng qua tĩnh mạch đuôi ở liều được xác định bởi công thức tính tương tự được mô tả ở trên dựa vào dữ liệu khối lượng cơ thể đo được. Thể tích khối u trung bình ở mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể ở mỗi ngày đo được tính toán, và nó đóng vai trò làm chỉ số để đánh giá hoạt tính kháng u *in vivo* của mỗi kháng thể.

Trong các thử nghiệm trên, máu được thu thập bằng cách lấy mẫu máu ổ mắt từ hIL6R-tgm được chia thành các nhóm như trên khi gây mê bằng isofluran trong một giờ, 1, 2, 3 và 7 ngày sau khi sử dụng lần đầu dung dịch kháng thể. Máu thu được được chuyển vào dây tám ống cho mỗi số lượng cá thể và để trên đá. Sau khi ly tâm loạt tám ống này ở 1900 x g trong 10 phút ở 4°C, chất nổi bề mặt sau khi ly tâm được thu gom làm thành phần huyết tương, và được chuyển đến loạt tám ống khác trên mỗi số lượng cá thể và bảo quản ở -30°C.

Nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương được đo bằng phương pháp điện hóa phát quang (ECL). Dung dịch hIL6R được bổ sung vào đĩa MULTI-ARRAY PR (Meso Scale Diagnostics, LLCs), để yên ở 37°C trong một giờ, và hIL6R được giữ cố định trên đĩa. Đối với đường cong chuẩn, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 và H0041-mFa55/L1088-ml0 được điều chế ở các nồng độ huyết tương là 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, và 0,125 µg/mL; và H0002-mFa55/L1058-ml0 được điều chế ở các nồng độ huyết tương là 64, 32, 16, 8, 4, 2, và 1 µg/mL. Sau khi bổ sung dung dịch 1 M Tris-HCl, pH 8,0 chứa 0,05% Tween20 và 1% BSA vào đĩa được cố định hIL6R, mẫu huyết tương được pha loãng 250 lần trong dung dịch axit axetic 0,3 M, cũng như mẫu đường cong chuẩn được bổ sung vào nhanh chóng, và dung dịch ATP cũng được bổ sung vào và trộn. Sau khi đĩa được để yên trong một giờ ở nhiệt độ phòng, kháng thể kháng IgG của chuột được gắn nhãn biotin (Southern Biotechnology Associates, Inc) được bổ sung và để yên ở nhiệt độ phòng trong một giờ. Sau đó, Streptavidin SULFO-TAG Labeled (Meso Scale Diagnostics, LLC) được bổ sung, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong một giờ, sau đó là bổ sung hệ đệm đọc T (Meso Scale Diagnostics, LLC), và phản ứng được đo bằng SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) được sử dụng để tính toán các mức kháng thể trong huyết tương chuột.

Tương tự, kháng thể kháng asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries) được hòa tan trong 1 mL nước cất (Otsuka Pharmaceutical Factory) và sau đó được pha loãng bằng 4 mL PBS. Kháng thể kháng asialo GM1 được điều chế theo cách này được sử dụng trong màng bụng cho 91 con chuột hIL6R-tgm ở liều 0,1 mL mỗi con chuột. Một ngày sau, dung dịch trộn được điều chế trong đó cùng một thể tích chất nền Matrigel (Corning) được bổ sung vào huyền phù tế bào của hIL6R-Hepa1-6 được tạo huyền phù tới 1×10^8 /mL trong dung dịch muối Hanks' Balanced (Sigma). Dung dịch trộn này được tiêm dưới da vào 91 con chuột hIL6R-tgm ở liều

0,2 ml mỗi con chuột, và các tế bào được cấy ghép. Đường kính khối u của chuột được đo bằng thước kẹp, và thể tích khối u được xác định bằng $(\text{trục lớn}) \times (\text{trục nhỏ}) \times (\text{trục nhỏ}) \times (1/2)$. Phép đo đường kính khối u được thực hiện bởi cá thể không biết thành phần của dung dịch thuốc được sử dụng cho mỗi con chuột. Các đường kính khối u và khối lượng cơ thể của 91 con chuột hIL6R-tgm nêu trên được đo vào ngày thứ 10 sau khi cấy ghép tế bào. Dựa vào giá trị này, thực hiện ngẫu nhiên trên các con chuột, và các con chuột được chia thành 4 nhóm mỗi nhóm 6 con, mỗi nhóm nhận dung dịch kháng thể tương ứng theo đường tĩnh mạch đuôi từ bốn trong số các dung dịch kháng thể được thể hiện trong Bảng 67, ngoại trừ H0002-mFa55/L1058-m10. Liều (mL) dung dịch kháng thể được sử dụng được tính theo công thức $(0,01 \text{ (mL/g)}) \times (\text{khối lượng cơ thể (g) của mỗi con chuột})$. Sau đó, đường kính khối u và khối lượng cơ thể của hIL6R-tgm được phân nhóm nêu trên được đo tương tự vào ngày thứ 13, 17, và 20 sau khi cấy ghép. Vào ngày thứ 17 sau khi cấy ghép, bốn dung dịch kháng thể trong số các dung dịch kháng thể được thể hiện trong Bảng 67, ngoại trừ H0002-mFa55/L1058-m10, được sử dụng cho các nhóm tương ứng qua tĩnh mạch đuôi ở liều được xác định bởi công thức tính tương tự được mô tả ở trên dựa vào dữ liệu khối lượng cơ thể đo được. Thể tích khối u trung bình ở mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể ở mỗi ngày đo được tính toán, và nó đóng vai trò làm chỉ số để đánh giá hoạt tính kháng u *in vivo* của mỗi kháng thể.

Trong các thử nghiệm trên, máu được thu thập bằng cách lấy mẫu máu ổ mắt từ hIL6R-tgm được chia thành các nhóm như trên khi gây mê bằng isofluran trong một giờ, 3, và 7 ngày sau khi sử dụng lần đầu dung dịch kháng thể. Máu thu được được chuyển vào dây tám ống cho mỗi số lượng cá thể và để trên đá. Sau khi ly tâm loạt tám ống này ở 1900 x g trong 10 phút ở 4°C, chất nổi bề mặt sau khi ly tâm được thu gom làm thành phần huyết tương, và được chuyển đến loạt tám ống khác trên mỗi số lượng cá thể và bảo quản ở -30°C.

Nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương được đo bằng phương pháp điện hóa phát quang (ECL). Dung dịch hIL6R được bổ sung vào đĩa MULTI-ARRAY PR (Meso Scale Diagnostics, LLCs), để yên ở 37°C trong một giờ, và hIL6R được giữ cố định trên đĩa. Đối với đường cong chuẩn, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-m10, và H0052-mFa55/L1083-m10 được điều chế ở nồng độ huyết tương là 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, và 0,125 µg/mL. Sau khi bổ sung dung dịch 1 M Tris-HCl, pH 8,0 chứa 0,05% Tween20 và 1% BSA vào đĩa

được cố định hIL6R, mẫu huyết tương được pha loãng 250 lần trong dung dịch axit axetic 0,3 M, cũng như mẫu đường cong chuẩn được bổ sung vào nhanh chóng, và dung dịch ATP cũng được bổ sung vào và trộn. Sau khi đĩa được để yên trong một giờ ở nhiệt độ phòng, kháng thể kháng IgG của chuột được gắn nhãn biotin (Southern Biotechnology Associates, Inc) được bổ sung và để yên ở nhiệt độ phòng trong một giờ. Sau đó, Streptavidin SULFO-TAG Labeled (Meso Scale Diagnostics, LLC) được bổ sung, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong một giờ, sau đó là bổ sung hệ đệm đọc T (Meso Scale Diagnostics, LLC), và phản ứng được đo bằng SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) được sử dụng để tính toán các mức kháng thể trong huyết tương chuột.

Nồng độ kháng nguyên hòa tan trong huyết tương được đo bằng ECL. Mẫu huyết tương của chuột pha loãng 50 lần được trộn với kháng thể kháng IL6R của người được gắn nhãn SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, LLC) (R&D Systems), kháng thể kháng IL6R của người được gắn nhãn biotin (R&D Systems), và kháng thể kháng IL6R của người tocilizumab dư (sản phẩm được sản xuất nội bộ), và hỗn hợp được ủ qua đêm ở 37°C. Sau khi hỗn hợp được bổ sung vào đĩa 96 giếng tiêu chuẩn được phủ Streptavidin bị phong bế (Meso Scale Diagnostics, LLC), sau đó là bổ sung hệ đệm đọc, phản ứng được đo trên SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) được sử dụng để tính nồng độ của kháng nguyên hòa tan trong huyết tương chuột.

Đầu tiên, tác dụng kháng u, nồng độ kháng thể trong huyết tương, và nồng độ kháng nguyên trong huyết tương của IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0002-mFa55/L1058-ml0, và H0041-mFa55/L1088-ml0 được so sánh. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 72, 73 và 74, tương ứng.

Trong nghiên cứu này, so với nhóm nhận đối chứng isotyp IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, nhóm nhận MRAH-mFa55/MRAL-mk0 và H0002-mFa55/L1058-ml0 không thể hiện tốc độ ức chế sự sinh trưởng của khối u (TGI) mạnh hơn. Mặt khác, quan sát thấy TGI mạnh hơn ở nhóm nhận kháng thể chuyển H0041-mFa55/L1088-ml0 (Fig. 72). Quan sát thấy hiệu lực của thuốc yếu hơn ở nhóm chuột nhận MRAH-mFa55/MRAL-mk0 so với nhóm nhận H0041-mFa55/L1088-ml0, cho thấy rằng MRAH-mFa55/MRAL-mk0 được đào thải nhanh hơn H0041-mFa55/L1088-ml0 và không thể duy trì nồng độ đủ để chứng minh hiệu lực của thuốc (Fig. 73).

Ngoài ra, sự tích tụ hIL6R hòa tan không được quan sát thấy ở nhóm được điều trị bằng H0002-mFa55/L1058-ml0. Ở nhóm được điều trị bằng H0041-mFa55/L1083-ml0, sự tích tụ IL6R hòa tan xảy ra với lượng ít hơn so với nhóm được điều trị bằng MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (Fig. 74).

Tiếp theo, tác dụng kháng u, nồng độ kháng thể trong huyết tương, và nồng độ kháng nguyên trong huyết tương của IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 được so sánh. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 75, 76 và 77, tương ứng.

Trong nghiên cứu này, so với nhóm nhận đối chứng isotyp IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, các nhóm nhận MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0, và H0052-mFa55/L1083-ml0 thể hiện tốc độ ức chế sự sinh trưởng của khối u (TGI) mạnh hơn (Fig. 75). Mặt khác, khi so sánh nồng độ huyết tương của chúng, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 thể hiện độ thanh thải nhanh hơn so với H0052-mFa55/L1083-ml0, và quan sát thấy nồng độ trong máu thấp hơn (Fig. 76).

Ngoài ra, so với MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0052-mFa55/L1083-ml0 chỉ tích tụ IL6R hòa tan ít hơn (Fig. 77).

Các kết quả này cho thấy rằng ở chuột mang khối u, các kháng thể chuyển tác dụng kháng u tương đương hoặc mạnh hơn kháng thể không chuyển; tuy nhiên, không giống như kháng thể không chuyển, các kháng thể chuyển không liên kết với hIL6R ở các mô bình thường. Các kết quả này cho thấy rằng ngay cả khi đã bị ung thư, nồng độ ATP ngoại bào ở các mô bình thường và máu là không đủ cao để kích thích khả năng liên kết của các kháng thể chuyển.

Ví dụ 16: Hoạt tính trung hòa phụ thuộc ATP của kháng thể kháng PD1 có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết hợp như được thể hiện trong Bảng 68 để biểu hiện và tinh chế các kháng thể kháng PD-1 theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể

Bảng 68

Tên kháng thể	VH	CH	VL	CL
mPD1F2VH-mF18/ mPD1F2VL-mk1	mPD1F2VH SEQ ID NO: 201	mF18 SEQ ID NO: 203	mPD1F2VL SEQ ID NO: 202	mk1 SEQ ID NO: 185
H5029-mFa31/ L3021-ml0	H5029 SEQ ID NO: 204	mFa31 SEQ ID NO: 208	L3021 SEQ ID NO: 205	ml0 SEQ ID NO: 212
H5041-mFa31/ L3023-ml0	H5041 SEQ ID NO: 206		L3023 SEQ ID NO: 207	

Hoạt tính trung hòa của các kháng thể được mô tả trong Bảng 68 đối với tương tác PDL1-PD1 được đánh giá theo phương pháp dưới đây.

Ban đầu, đối với các kháng nguyên, mPD1-G1CH2 (SEQ ID NO: 209) và mPDL1-G1dCH2His (SEQ ID NO: 210) được tổng hợp di truyền và cài xen vào các plasmid để biểu hiện ở động vật. Protein kháng nguyên được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp dưới đây. Các plasmid được điều chế được đưa vào bằng phương pháp lipofection thành dòng FreeStyle 293-F có nguồn gốc từ tế bào bào thai thận của người (Invitrogen) được tạo huyền phù trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen) ở mật độ phù hợp và được gieo vào các bình. Các kháng nguyên được tinh chế từ chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy của các tế bào được nuôi cấy trong thiết bị ủ CO₂ (37°C, 8% CO₂, 125 vòng/phút) trong bốn ngày theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quang phổ kế được sử dụng để đo độ hấp thụ ở 280 nm của các dung dịch kháng nguyên được tinh chế. Nồng độ của các kháng nguyên được tinh chế được tính toán bằng hệ số hấp thụ được tính toán bằng phương pháp PACE từ các giá trị đo thu được (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

mPD1-G1CH2 (SEQ ID NO: 209), là PD1 của chuột được dung hợp với Fc, được pha loãng đến 5 µg/mL (55 nM) bằng 0,1 M NaHCO₃, 0,05% NaN₃, và 100 µL dung dịch pha loãng được bổ sung vào đĩa 96 giếng, để yên qua đêm ở 4°C, và được giữ cố định trên bề mặt đĩa. Sau khi giếng được rửa ba lần bằng TBS và 0,1% Tween20, 250 µL dung dịch BSA được pha loãng đến 2% bằng TBS được bổ sung vào mỗi giếng để phong bế bề mặt đĩa. Sau đó việc rửa được thực hiện ba lần. mPDL1-G1dCH2His (SEQ ID NO: 210), là PDL1 của chuột được dung hợp với

kháng thể Fc và đuôi His, được pha loãng trong TBS tới nồng độ cuối cùng là 55 nM; dung dịch của các kháng thể được mô tả trong Bảng 68 được pha loãng tới nồng độ cuối cùng là 6,25, 1,56, 0,390, 0,0977, 0,0061, và 0 $\mu\text{g/mL}$; và dung dịch ATP được pha loãng tới nồng độ cuối cùng là 0, 1, 10, và 100 μM được trộn tới tổng cộng là 100 μL . Sau đó hỗn hợp này được bổ sung vào mỗi giếng và để yên ở 37°C trong một giờ. Sau đó mỗi giếng được rửa ba lần bằng 0,1% Tween20 và TBS, đã được điều chế để có nồng độ ATP bằng với nồng độ ATP của các dung dịch được bổ sung vào mỗi giếng. Anti-His-tag mAb-HRP-Direct (MBL Life Science) được pha loãng 10.000 lần trong hệ đệm phong bế để có nồng độ ATP bằng với nồng độ ATP của các dung dịch được bổ sung vào mỗi giếng, trong đó 100 μL được bổ sung vào mỗi giếng, và được để yên ở 37°C trong một giờ. Sau đó mỗi giếng được rửa ba lần bằng 0,1% Tween20 và TBS, mà được điều chế để có nồng độ ATP bằng với nồng độ ATP của các dung dịch được bổ sung vào mỗi giếng. Sau đó, 100 μL dung dịch TMB được bổ sung vào mỗi giếng, và đĩa được để yên ở 37°C trong một giờ, và 50 μL H_2SO_4 1M được bổ sung vào mỗi giếng để làm dừng phản ứng. Độ hấp thụ của mỗi giếng ở 450 nm sau đó được phát hiện trên máy đọc khay vi thể hấp thụ (Wako Sunrise).

Giá trị độ hấp thụ của giếng không có kháng thể ở cùng điều kiện nồng độ ATP được đặt là 100% liên kết PD1-PDL1, và mức độ tỷ lệ khả năng liên kết giảm bằng cách bổ sung kháng thể được đánh giá. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 78 và 79.

Các kết quả này thể hiện rằng hoạt tính trung hòa của mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 bloc của PD1/PDL-1 không bị ảnh hưởng bởi nồng độ ATP, trong khi hoạt tính trung hòa của H5029-mFa31/L3021-ml0 và H5041-mFa31/L3021-ml0 mạnh hơn với nồng độ ATP cao hơn trong các thử nghiệm. Các kết quả này đã xác nhận rằng H5029-mFa31/L3021-ml0 và H5041-mFa31/L3021-ml0 có hoạt tính trung hòa và hoạt tính liên kết phụ thuộc ATP.

Hệ thống thử nghiệm luciferaza (Promega) được sử dụng để đo hoạt tính trung hòa *in vitro*. Đối với tế bào hiệu ứng, chất phụ hPDL1-CHO cho thử nghiệm sinh học phong bế PD-1/PD-L1, Core Kit (Promega) được sử dụng. Đối với tế bào đích, các tế bào Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1 được sản xuất nội bộ được sử dụng. Đầu tiên, gen của protein dung hợp của mPD1 ngoại bào và hPD1 nội bào (SEQ ID NO: 214) được đưa vào các tế bào Jurkat-NFAT-Luc2 (Promega) theo cách đã biết đối

với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tạo ra các tế bào Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1. Tương tác của hPDL1 trên hPDL1-CHO với protein dung hợp của mPD1 ngoại bào và hPD1 nội bào trên Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1 được sử dụng làm tương tác PD-1/PDL-1 để đánh giá hoạt tính trung hòa *in vitro*.

Mỗi giếng của đĩa 96 giếng được bổ sung 100 μL chất phụ của bộ kit hPDL1-CHO, được điều chế tới nồng độ $4 \times 10^5/\text{mL}$ bằng môi trường, và đĩa được để yên qua đêm ở 37°C . Đối với môi trường nuôi cấy, 90% Ham's F-12, 10% FBS, 250 μg Genetixin, và 200 μg Hygromycin được sử dụng. Các chất nổi bề mặt từ mỗi giếng được hút ra; và 20 μL dung dịch của các kháng thể được mô tả trong Bảng 68 được pha loãng bằng hệ đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ được trộn với 20 μL dung dịch AMP được pha loãng bằng hệ đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 0, 1, 10, và 100 μM , và 40 μL dung dịch tế bào NFAT-Luc2-hPD1-mPD1-Jurkat được điều chế bằng hệ đệm thử nghiệm để đạt số lượng tế bào là $5 \times 10^4/\text{giếng}$. Hỗn hợp này được bổ sung vào mỗi giếng và để yên ở 37°C trong bốn giờ. Đối với hệ đệm thử nghiệm, 98% RPMI 1640 và 2% FBS được sử dụng. Đĩa sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, và 80 μL thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa.

Giá trị độ phát quang của mỗi giếng ở mỗi điều kiện nồng độ AMP được chia cho giá trị độ phát quang của giếng không có kháng thể là số lần cảm ứng, và nó đóng vai trò làm chỉ số để đánh giá hoạt tính của mỗi kháng thể để trung hòa tương tác PD-1/PDL-1. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 80. Trong hình, số lần cảm ứng được biểu thị là đơn vị sáng tương đối (RLU).

ATP cũng được làm thử nghiệm tương tự như AMP, và 100 ml hPDL1-CHO được điều chế ở nồng độ $4 \times 10^5/\text{mL}$ bằng môi trường được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, và đĩa được để yên ở 37°C qua đêm. 90% Ham's F-12, 10% FBS, 250 μg Geneticin, và 200 μg Hygromycin được sử dụng cho môi trường nuôi cấy. Các chất nổi bề mặt từ mỗi giếng được hút ra; và 20 μL dung dịch kháng thể được mô tả trong Bảng 68 được pha loãng bằng hệ đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ được trộn với 20 μL dung dịch ATP được pha loãng bằng hệ đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối cùng là 0, 12,5, và 125 μM , và 40 μL dung dịch tế bào NFAT-Luc2-hPD1-mPD1-Jurkat được điều chế bằng hệ đệm thử nghiệm để đạt số

lượng tế bào là 5×10^4 /giếng, và hỗn hợp được bổ sung vào mỗi giếng và để yên ở 37°C trong bốn giờ. Đối với hệ đệm thử nghiệm, 98% RPMI 1640 và 2% FBS được sử dụng. Đĩa sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, và 80 μ L thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng thiết bị đọc đĩa.

Giá trị độ phát quang của mỗi giếng ở mỗi điều kiện nồng độ AMP được chia cho giá trị độ phát quang của giếng không có kháng thể là số lần cảm ứng, và nó đóng vai trò làm chỉ số để đánh giá hoạt tính của mỗi kháng thể để trung hòa tương tác PD-1/PDL-1. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 81. Trong hình, số lần cảm ứng được biểu thị là đơn vị sáng tương đối (RLU).

Ví dụ 17: Hoạt tính kháng u qua trung gian ADCC phụ thuộc ATP của kháng thể kháng PD1 có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết hợp như được thể hiện trong Bảng 69 để biểu hiện và tinh chế các kháng thể kháng PD-1 theo cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể

Bảng 69

Tên kháng thể	VH	CH	VL	CL
IC17HdK-mFa55/ IC17L-mk1	IC17HdK SEQ ID NO: 187	mFa55 SEQ ID NO: 184	IC17L SEQ ID NO: 188	mk1 SEQ ID NO: 185
mPD1F2VH- mFa55/ mPD1F2VL-mk1	mPD1F2VH SEQ ID NO: 201		mPD1F2VL SEQ ID NO: 202	
H5041-mFa55/ L3023-ml0	H5041 SEQ ID NO: 206		L3023 SEQ ID NO: 207	ml0 SEQ ID NO: 212

Các vùng hằng định chuỗi nặng của các kháng thể này được biến đổi thành mFa55 có hoạt tính ADCC được tăng cường qua việc bổ sung các cải biến tăng cường liên kết Fc γ RIV với mIgG2a. Do đó, nó được xem là có thể gây ra hoạt tính

ADCC trên các tế bào biểu hiện PD-1 và loại bỏ các tế bào biểu hiện PD-1. Các kháng thể được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng u *in vivo* và để đánh giá độ thải trừ của các tế bào biểu hiện PD-1 theo phương pháp dưới đây.

Dòng tế bào ung thư đại trực tràng ở chuột Colon38 (NCI) được cấy ở mật độ 5×10^6 bằng Matrigel (Corning) dưới da bụng phải của chuột C57BL/6J (Japan Charles River) để tạo thành khối u rắn. Vào ngày thứ mười bốn sau khi cấy, IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1 được sử dụng trong tĩnh mạch (i.v.) ở liều 15 mg/kg, mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 ở liều 1,5, 5, và 15 mg/kg, và H5041-mFa55/L3023-ml0 ở liều 25,5 và 100 mg/kg, tương ứng (n=7 mỗi nhóm). Ngoài ra, vào ngày thứ mười bảy sau khi cấy ghép, nhóm H5041-mFa55/L3023-ml0 được nhận các kháng thể giống nhau trong tĩnh mạch (i.v.) ở liều 25,5 và 100 mg/kg, tương ứng. Kết quả là, quan sát được tác dụng kháng u ở tất cả các nhóm sử dụng kháng thể ngoại trừ nhóm đối chứng âm (Fig. 82).

Độ thải trừ của các tế bào biểu hiện PD-1 trong mô khối u sau khi sử dụng các kháng thể tương ứng được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Các khối u rắn của Colon38 được cho tạo thành như được mô tả ở trên, và vào ngày thứ mười bốn sau khi cấy, IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1 (đối chứng isotyp) được sử dụng trong tĩnh mạch (i.v.) ở liều 15 mg/kg, mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 ở liều 1,5, 5, và 15 mg/kg, và H5041-mFa55/L3023-ml0 ở liều 25,5 và 100 mg/kg, tương ứng (n=3 mỗi nhóm). Lá lách và mô khối u của mỗi con chuột được thu thập ba ngày sau khi sử dụng kháng thể. Lá lách được cắt nhỏ bằng nhíp, 10% RPMI 1640 được bổ sung FBS được thêm vào, và ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, sau đó chất nổi bề mặt được loại bỏ. 2 mL hệ đệm dung giải ACK (Thermo Fisher Scientific) được bổ sung, và sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 2,5 phút, mẫu tan máu được sử dụng là các tế bào lá lách để phân tích đếm tế bào theo dòng. Mô khối u được cắt nhỏ bằng kéo, sau đó là bổ sung enzym theo quy trình bộ kit phân ly khối u (Miltenyi), và tiếp tục được cắt nhỏ bằng bộ phân ly MACS (Miltenyi Biotec) nhẹ nhàng. Với việc bổ sung 10% RPMI-1640 được bổ sung FBS, nó được ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, và chất nổi bề mặt được loại bỏ và được sử dụng để phân tích tế bào theo dòng như các tế bào khối u. Tế bào lách và tế bào khối u được chuyển sang đĩa đáy V (Corning), ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, và chất nổi bề mặt được loại bỏ. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 100 μ L thuốc thử phong bế FcR (Miltenyi Biotec) được pha loãng 10 lần trong PBS (hệ đệm FACS) chứa 1%

FBS và 2 mM EDTA (Sigma). Sau khi ủ các tế bào ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, 0,4 μ L BUV737 kháng CD3e của chuột (BD), 0,1 μ L Zombie Aqua (Biolegend), 0,4 μ L PerCP/Cy5.5 kháng CD8a của chuột (Biolegend), 0,4 μ L PE/Cy7 kháng CD4 của chuột (Biolegend), 0,2 μ L APC-R700 kháng CD45 của chuột (BD), 0,4 μ L FITC kháng CD278 của người/chuột/chuột cống (Biolegend), 0,4 μ L APC/Fire™ 750 kháng CD25 của chuột (Biolegend), và 0,4 μ L APC kháng CD279 của chuột (Biolegend), đã được xác nhận là không cạnh tranh với mỗi kháng thể PD1 được sử dụng, được thêm vào mỗi giếng, và hệ đệm FACS được bổ sung ở nồng độ 20 μ L/giếng. Sau 30 phút ủ ở 4°C, 100 μ L hệ đệm FACS được bổ sung, ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, và chất nổi bề mặt được loại bỏ. Dựa trên quy trình của bộ đệm nhuộm màu Foxp3/yếu tố phiên mã (eBioscience), dung dịch cô đặc cố định/thấm và dung dịch pha loãng cố định/thấm được trộn lẫn, và 200 μ L hỗn hợp được bổ sung vào mỗi giếng. Sau khi ủ ở 4°C trong 30 phút và ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, chất nổi bề mặt được loại bỏ. Hệ đệm thấm được bổ sung ở 200 μ L, và sau khi ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, chất nổi bề mặt được loại bỏ. Quy trình rửa được thực hiện một lần nữa. eFluor450 kháng Foxp3 của chuột/chuột cống (eBioscience) ở 0,4 μ L và PE kháng CD152 của chuột (BD) ở 0,4 μ L được bổ sung vào mỗi giếng, và hệ đệm FACS được bổ sung ở 20 μ L/giếng. Sau khi ủ ở 4°C trong 30 phút, 100 μ L hệ đệm FACS được bổ sung và sau khi ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, chất nổi bề mặt được loại bỏ. Hệ đệm thấm được bổ sung ở 200 μ L vào mỗi giếng, và sau khi ly tâm ở 400 x g trong 5 phút, chất nổi bề mặt được loại bỏ. Các mẫu được tạo huyền phù lại bằng 200 μ L hệ đệm FACS, và đo trên thiết bị đếm tế bào theo dòng FACS Fortessa (BD). Đối với việc phân tích biểu hiện, phần mềm FlowJo được sử dụng. Các tế bào dương tính với CD4 được giám sát trên quần thể tế bào cần phân tích để phân tích sự biểu hiện của Foxp3 và PD1. Mức độ biểu hiện PD1 ở quần thể các tế bào CD4⁺ Foxp3⁻ được tính toán từ cường độ huỳnh quang. Kết quả là, mức độ biểu hiện PD1 ở cả các tế bào lá lách và các tế bào khối u có xu hướng giảm ở các nhóm được sử dụng 5 và 15 mg/kg mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1, như ở nhóm được sử dụng 25,5 và 100 mg/kg H5041-mFa55/L3023-ml0, mức độ biểu hiện PD1 có xu hướng giảm chỉ ở các tế bào khối u (Fig. 83A và Fig. B). Được xác nhận rằng tất cả các kháng thể chuyển liên kết với PD1 theo cách phụ thuộc ATP bộc lộ hiệu lực của thuốc kháng lại khối u, trong khi

đáp ứng toàn thân (sự giảm mức độ biểu hiện PD1) không xảy ra, và được xác nhận rằng các kháng thể chuyển có đặc tính thể hiện hoạt tính đặc hiệu tại vị trí khối u.

Ví dụ 18: Phân tích cấu trúc tinh thể của các kháng thể liên kết hIL6R có các đặc tính liên kết phụ thuộc ATP

Phân tích tinh thể học tia X của phức hợp ATP, miền ngoại bào hIL6R (shIL6R), và đoạn Fab của kháng thể liên kết thụ thể IL6 của người (hIL6R) H0041L1088 (chuyển ATP) thu được ở Ví dụ 13 được thực hiện.

(18-1) Điều chế các kháng thể có độ dài đầy đủ H0041L1088

Việc điều chế và tinh chế các kháng thể có độ dài đầy đủ H0041L1088 (VH: SEQ ID NO: 194; CH: SEQ ID NO: 217, VL: SEQ ID NO: 195, CL: SEQ ID NO: 189) có dạng IgG1 của người được thực hiện bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

(18-2) Điều chế đoạn Fab H0041L1088.

Mẫu kháng thể có độ dài đầy đủ H0041L1088 được phân đoạn thành Fab và Fc bằng cách sử dụng Papain (SIGMA-ALDRICH, 10108014001) ở các điều kiện là 35°C, khoảng 18 giờ, và sau đó đưa vào tinh chế cột trên HiTrap SP HP 1 mL (GE Healthcare) và HiTrap MabSelect SuRe 1 mL (GE Healthcare) và tinh chế SEC bằng HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) để điều chế các mẫu Fab.

(18-3) Điều chế shIL6R

Dựa trên trình tự axit amin của UniProtKB: P08887 (IL6RA_HUMAN) (SEQ ID NO: 213), các miền 2 và 3 của nó (các axit amin 111-320) được tổng hợp di truyền và hợp nhất thành các vector biểu hiện. Đối với quá trình tổng hợp gen, trình tự tín hiệu để biểu hiện bài tiết được bổ sung tại tận cùng N, đuôi FLAG + đuôi His x 8 được bổ sung ở tận cùng C để tinh chế, và cải biến C193S được đưa vào để chỉnh sửa sự ghép cặp Cys-Cys sai mà thu được khi loại bỏ miền 1. Biểu hiện protein bởi hệ thống biểu hiện Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) được thực hiện khi có mặt Kifunensin (Santa Cruz Biotechnology) bằng cách sử dụng các plasmit biểu hiện thu được, và thu được chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy biểu hiện chứa protein quan tâm. Từ điều này, mẫu shIL6R được điều chế qua quá trình

tinh chế ái lực bằng cột tinh chế đuôi His cOmplete™ 5 mL (SIGMA-ALDRICH) cũng như tinh chế SEC bằng HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare).

(18-4) Điều chế phức hợp ba yếu tố Fab-shIL6R-ATP H0041L1088

Mẫu shIL6R được bổ sung Endoglycosidaza F1(EndoF1) đối với sự phân hủy chuỗi đường loại N và Enterokinaza (SIGMA-ALDRICH, 11334115001) đối với sự phân hủy đuôi His x 8, và sau khi để yên ở nhiệt độ phòng trong một ngày, qua xử lý bằng HisTrap EXCEL 1 mL (GE Healthcare) và tinh chế SEC bằng Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) được thực hiện. Sau khi bổ sung mẫu Fab H0041L1088, đoạn tinh chế thu được được làm giàu bằng quá trình siêu lọc, và việc tinh chế SEC bằng Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) sử dụng 20 mM HEPES, pH 7,3, 100 mM NaCl, 0,5 mM ATP làm hệ đệm để điều chế các mẫu phức hợp (Complex). Các mẫu phức hợp cho quá trình kết tinh được điều chế bằng cách làm giàu siêu lọc các đoạn tinh chế thu được.

(18-5) Điều chế các tinh thể phức hợp ba yếu tố Fab-shIL6R-ATP H0041L1088

Sự kết tinh bằng phương pháp khuếch tán hơi sitting drop được thực hiện ở điều kiện 21°C sử dụng các mẫu phức hợp để kết tinh, và với điều kiện nguồn cấp 60 mM Tris, pH 7,5, 12,0% khối lượng/thể tích polyetylen glycol 1500 (Polyetylen glycol 1.500), 60 mM amoni sulfat (Amoni sulfat), các tinh thể thích hợp để phân tích tinh thể học tia X đã thu được.

(18-6) Phép đo dữ liệu nhiễu xạ tia X từ các tinh thể phức hợp ba yếu tố Fab-shIL6R-ATP H0041L1088 và sự xác định cấu trúc tinh thể

Các tinh thể thu được được ngâm trong dung dịch 68 mM Tris, pH 7,5, 13,6% khối lượng/thể tích polyetylen glycol 1500 (Polyetylen glycol 1.500), 68 mM ammoni sulfat (Ammoni sulfat), 14,6% etylen glycol (Etylen Glycol), và 0,375 mM ATP, và sau đó làm đông lạnh trong nitơ lỏng. Dữ liệu đo nhiễu xạ tia X được đo trong điều kiện ánh sáng bức xạ của Tổ chức Nghiên cứu Máy gia tốc Năng lượng Cao, Nhà máy Photon BL-17A. Trong quá trình đo, các tinh thể liên tục được đặt dưới dòng nitơ -178°C để duy trì trạng thái đông lạnh. Các hình ảnh nhiễu xạ thu được được xử lý bằng autoPROC (Acta Cryst. D67:293-302 (2011)), và dữ liệu cường độ nhiễu xạ lên đến độ phân giải 2,76 Angstrom đã được thu thập.

Sử dụng dữ liệu cường độ nhiễu xạ tia X thu được, cấu trúc ban đầu được xác định bằng phương pháp thay thế phân tử sử dụng Phaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40,658-674), sử dụng cấu trúc tinh thể Fab và shIL6R đã biết của PDB ID = 1N26 làm mô hình tìm kiếm. Sau đó, xây dựng mô hình và tinh chế bằng coot (Acta Cryst. D66: 486-501 (2010)) và refmac5 (Acta Cryst. D67: 355-367 (2011)) cũng như phenix.refine (Acta Cryst. D68: 352-367 (2012)) được lặp lại, dẫn đến tọa độ được tinh chỉnh cuối cùng. Các số liệu thống kê về tinh thể học được thể hiện trong Bảng 70. Lưu ý rằng trong số các tọa độ của cấu trúc tinh thể, số gốc axit amin trong Fab được đưa ra dựa trên sơ đồ đánh số Kabat và số gốc axit amin trong kháng nguyên, shIL6R, được đưa ra để khớp với số gốc axit amin của UniProtKB: P08887 (IL6RA_HUMAN). Mặc dù có hai phức hợp trong các đơn vị không đối xứng của tinh thể này, quá trình dime hóa đặc hiệu được gọi là hoán đổi miền đã được quan sát thấy trong miền 2 của shIL6R. Các dime này không được tìm thấy trong cấu trúc tinh thể của shIL6R của PDB ID=1N26, làm cho chúng trở thành duy nhất đối với cấu trúc shIL6R được sử dụng ở đây.

Bảng 70

< Dữ liệu đo >	
Chiều dài bước sóng đo (Angstrom)	0,98
Số tinh thể đo được	1
Nhóm không gian	C222
Hằng số pin	
a b c (Angstrom)	103,043 185,612 152,085
$\alpha \beta \gamma$ (°)	90,00 90,00 90,00
Số phức hợp trong đơn vị không đối xứng	2
Độ phân giải (Angstrom)	90,09 - 2,757 (2,86 - 2,76)
Số phản xạ quan sát được / Số phản xạ duy nhất	508114 / 38008
Phần dư	13,37 (13,66)
Tính trọn vẹn (%)	99,99 (100,00)
Tỷ lệ S/N cường độ nhiễu xạ	18,9 (3,1)
Rmerge	0,106 (0,868)
< Sự tinh chỉnh >	
Rwork / Rfree	0,1923 / 0,2656

Số nguyên tử	9244
Không phải phân tử nước	9181
Phân tử nước	63
RMSD (độ lệch căn bậc hai trung bình) từ giá trị lý thuyết	
Độ dài liên kết (Angstrom)	0,008
Góc liên kết (°)	1,05
Đồ thị Ramachandran	
Vùng ưu tiên (%)	95,95
Vùng cho phép (%)	3,72
Vùng không cho phép (%)	0,34
Các giá trị trong ngoặc đơn là các giá trị ở độ chính xác ngoài cùng.	

(18-7) Tương tác giữa H0041L1088 và ATP

Như được thể hiện trên Fig. 84, ATP được nhận biết chủ yếu bởi chuỗi nặng của kháng thể. Cụ thể là, nhóm vòng adenin của ATP được nhận biết bởi mỗi chuỗi bên chuỗi nặng của kháng thể CDR1: T33, CDR3: Y95, L98, N100B, và W100C, và mỗi chuỗi chính trong số G96, L100A, và W100C. Cụ thể là, các liên kết hydro được hình thành giữa oxy carbonyl của khung G96 và L100A và NH₂ vị trí-6 của ATP, và giữa nhóm NH amit khung của W100C và N vị trí-1 của ATP; và các tương tác chẳng hạn như CH- π (π) và π - π được hình thành giữa những chuỗi bên của Y95, L98, và W100C và nhóm vòng adenin. Kháng thể nhận biết nhóm vòng adenin của ATP một cách mạnh mẽ. Nhóm riboza được nhận biết bởi tương tác van der Waals với các chuỗi bên của chuỗi nặng tương ứng CDR1: T33 và CDR2: H56 và Y58. Nhóm triphospho được nhận biết bởi các chuỗi bên của chuỗi nặng CDR2: S52, S52A, Y55, và H56, và chuỗi chính của S52A và Q53. Cụ thể là, chuỗi bên S52 và chuỗi bên S52A, cũng như nhóm chuỗi chính NH và nhóm chuỗi chính NH Q53 hình thành mạng lưới liên kết hydro chặt chẽ với nhóm triphospho, đóng vai trò chủ yếu trong việc nhận biết nhóm triphospho.

(18-8) Tương tác giữa H0041L1088 và hIL6R

Dựa trên cấu trúc tinh thể này, các gốc axit amin của shIL6R chứa một hoặc nhiều nguyên tử không phải hydro nằm ở khoảng cách trong phạm vi 4,2 Angstrom từ H0041L1088 Fab hoặc ATP được chọn làm các gốc epitop, và chúng được thể

hiện trên trình tự axit amin shIL6R (Fig. 85). Chi tiết về tương tác của các gốc epitop này với kháng thể được thể hiện trên Fig. 86 và Fig. 87. Các gốc epitop này tạo thành tương tác van der Waals, liên kết hydro, tương tác tĩnh điện, v.v. với các gốc của chuỗi nhẹ CDR1: D27B, G28, D29, A31, và Y32, và CDR3: R91, S92, P93, G94, và P95, và chuỗi nặng CDR2: H56 và Y58 và CDR3: L98, Y99, N100B, và W100C của kháng thể; và chúng được liên kết chặt chẽ với kháng thể.

(18-9) Cơ chế liên kết kháng nguyên phụ thuộc ATP

Ngoài ra, trong liên kết H0041L1088 Fab-shIL6R như được thể hiện trên Fig. 86 và Fig. 87, sự tiếp xúc liên phân tử lớn được hình thành giữa F298 của shIL6R và ATP liên kết với H0041L1088 Fab. Vì tương tác này bị mất ở trạng thái không liên kết với ATP, nên tương tác trực tiếp này giữa kháng nguyên và ATP liên kết với H0041L1088 Fab được cho là yếu tố chính trong liên kết phụ thuộc ATP. Về mặt cấu trúc, ATP được cho là đóng góp vào sự ổn định cấu trúc của CDR3 chuỗi nặng thông qua liên kết hydro và tương tác van der Waals với các gốc CDR3 chuỗi nặng. Độ ổn định của cấu trúc chuỗi nặng CDR3 ở dạng liên kết với kháng nguyên của nó bằng cách liên kết với ATP được cho là dẫn đến việc tăng cường đáng kể sự tương tác trực tiếp của chuỗi nặng CDR3: L98 hoặc Y99 với shIL6R, do đó góp phần vào khả năng liên kết phụ thuộc vào ATP.

Ví dụ 19: Sự tăng cường hoạt tính chủ vận bằng các kháng thể kháng CD137 được cải biến

(19-1) Điều chế các kháng thể để đánh giá

Đối với trường hợp các cải biến axit amin khác nhau để tăng pI được đưa vào vùng hằng định chuỗi nặng với hoạt tính liên kết với FcγRIIb tăng lên, ảnh hưởng của các cải biến axit amin này đối với hoạt tính chủ vận CD137 và đối với động học huyết tương và hiệu quả của thuốc ở chuột hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90 được đánh giá. Đầu tiên, như được mô tả trong Ví dụ 7-1, Ví dụ 7-2, và Ví dụ 7-3, A375-MY201aPh/B167-Lamlib, A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, A375-SCF057aPh/B167-Lamlib, và IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0 được điều chế.

(19-2) Đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 phụ thuộc ATP in vitro của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến bằng cách sử dụng thử nghiệm gen chỉ thị 4-1BB Jurkat

Đối với trường hợp các cải biến axit amin khác nhau để tăng pI được đưa vào vùng hằng định chuỗi nặng với hoạt tính liên kết với FcγRIIb tăng lên, để đánh giá ảnh hưởng của các cải biến axit amin này đối với hoạt tính chủ vận CD137, hoạt tính chủ vận CD137 của A375-MY201aPh/B167-Lamlib, A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, A375-SCF057aPh/B167-Lamlib, và IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0 được đánh giá.

Dòng tế bào GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004) được sử dụng để đo hoạt tính *in vitro* của các kháng thể được tạo ra. Mỗi giếng của đĩa 96 giếng được bổ sung 200 μL tế bào FcγRIIB CHO-K1 (Promega) được điều chế ở nồng độ 5×10^4 /mL với môi trường nuôi cấy được bổ sung, và đĩa được để yên qua đêm trong thiết bị ủ 5% CO₂ ở 37°C. Môi trường nuôi cấy CHO (90% Ham's F12, 10% FBS) được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Tiếp theo, toàn bộ môi trường nuôi cấy được loại bỏ bằng cách hút, và sau đó 25 μL dòng tế bào GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat được điều chế ở 2×10^6 /mL với môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1% FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Tiếp theo, 25 μL mỗi dung dịch kháng thể được pha loãng với môi trường thử nghiệm được bổ sung ở nồng độ cuối cùng là 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, và 10 μg/mL. Cuối cùng, 25 μL dung dịch ATP được pha loãng với môi trường thử nghiệm để tạo thành nồng độ cuối cùng là 250 μM được bổ sung. Đĩa được để yên trong 6 giờ trong thiết bị ủ 5% CO₂ ở 37°C, và sau đó để yên trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, và 75 μL thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng để làm thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, đơn vị sáng tương đối của mỗi giếng được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang của giếng không thêm kháng thể được xác định là “đơn vị sáng tương đối”, và đóng vai trò là chỉ số đánh giá hoạt tính chủ vận CD137 của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 88. Các kết quả này thể hiện rằng hoạt tính chủ vận CD137 được tăng lên bằng cách đưa vào các cải biến axit amin khác nhau để làm tăng pI.

(19-3) Nghiên cứu dược động học của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến ở chuột

(19-3-1) Sự tạo thành chuột hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90

Đầu tiên, chuột knock-in CD137 của người được tạo ra trong đó gen CD137 của chuột được thay thế bằng gen CD137 của người, bằng cách đưa vector thay thế gen CD137 của người vào tế bào gốc phôi của chuột (các tế bào ES) cùng với Nucleaza ngón tay kẽm (ZFN) mà nhắm đích CD137 của chuột. Sau đó, ZFN mARN nhắm đích gen Fcgr2b của chuột được tiêm vi tiêm vào trứng đã thụ tinh của chuột, và chuột knock-out Fcgr2b của chuột được tạo ra bằng cách chọn lọc các trứng được đưa vào với đột biến tại vị trí đích. Ngoài ra, vector BAC trong đó gen FCGR2B người được nhân bản được tiêm vi tiêm vào các trứng đã thụ tinh của chuột, và bằng cách chọn lọc từ chuột thu được từ những con được đưa vào vùng di truyền của gen FCGR2B của người, chuột chuyển gen FCGR2B của người đã được tạo ra (Iwayanagi. et al., J Immunol, 2015, 195, 3198-3205).

Bằng cách lai chuột thuộc ba dòng trên, một “chuột chuyển gen FCGR2B của người knock-out Fcgr2b knock-in CD137 của người” đã được thiết lập. Chuột này được đề cập đến là chuột hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90.

(19-3-2) Phép đo nồng độ kháng thể kháng CD137 của người trong huyết tương ở mô hình chuột hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90

Các kháng thể kháng CD137 của người tương ứng được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều đơn cho chuột CD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90 như được thể hiện trong Bảng 71. Máu được thu thập nhiều lần theo thời gian từ 5 phút đến 28 ngày sau khi sử dụng. Máu thu được được ly tâm để tách huyết tương. Huyết tương được bảo quản trong buồng đông lạnh cài đặt nhiệt độ dưới -20°C đến khi đo.

Bảng 71

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều [mg/kg]
1	3	A375-MY201aPh/ B167-Lamlib	Sử dụng liều đơn 7,5
2	3	A375-SCF041aPh/ B167-Lamlib	Sử dụng liều đơn 7,5

Nồng độ của mỗi kháng thể kháng CD137 của người trong huyết tương được đo bằng phương pháp điện hóa phát quang (ECL). hCD137 (Sino Biological Inc.) được pha loãng bằng PBS(-) và được thêm vào đĩa 96 giếng MULTI-ARRAY (Meso Scale Diagnostics, LLC). Đĩa được bổ sung hCD137 được lắc trong một giờ ở nhiệt độ phòng và hCD137 được giữ cố định trên đĩa. Để phong bế, dung dịch PBS chứa 1 mM ADP, 1% BSA, và 0,05% Tween-20 được thêm vào sau đó và đĩa được lắc trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Các đường cong chuẩn cho các kháng thể kháng CD137 của người tương ứng được điều chế ở nồng độ trong huyết tương là 640, 320, 160, 80, 40, 20, và 10 ng/mL. Các mẫu huyết tương được pha loãng bằng dung dịch PBS chứa 1mM ADP, 1%BSA, và 0,05% Tween-20 và mẫu đường cong chuẩn được bổ sung vào đĩa được cố định hCD137. Sau đó đĩa được lắc trong một giờ ở nhiệt độ phòng, và sau đó kháng thể được mô tả trong WO 2019112027 mà nhận biết đặc hiệu các vùng hằng định của các kháng thể kháng CD137 của người được bổ sung vào ở dạng kháng thể thứ cấp. Đĩa tiếp tục được lắc trong một giờ ở nhiệt độ phòng và kháng thể kháng thể ở bề mặt được gắn nhãn SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, LLC) sau đó được bổ sung vào đó. Đĩa tiếp tục được lắc trong một giờ ở nhiệt độ phòng và hệ đệm đọc T (Meso Scale Diagnostics, LLC) được pha loãng hai lần và chứa 1mM ADP được bổ sung vào đó. Nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương chuột được đo bằng cách phát hiện SULFO-TAG bằng bộ thu ảnh SECTOR (Meso Scale Diagnostics, LLC). Nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương chuột được tính toán bằng SOFTmax PRO (Molecular Devices).

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 89. A375-SCF041aPh/B167-Lamlib thể hiện độ thải trừ nhanh hơn A375-MY201aPh/B167-Lamlib. Điều này được cho là vì vùng hằng định chuỗi nặng của A375-SCF041aPh/B167-Lamlib được đưa vào với các cải biến axit amin làm tăng pI.

(19-4) Đánh giá hiệu lực của thuốc của các kháng thể kháng CD137 của người được cải biến ở chuột

(19-4-1) Sự tạo thành các dòng tế bào và mô hình chuột được cấy ghép dòng khối u tổng hợp

Đối với các tế bào, dòng tế bào C5 (LLC1/OVA/GPC3) vô tính LLC1/OVA/GPC3, tạo ra bằng cách đưa plasmit biểu hiện đối với ovalbumin (OVA) của gà và Glypican-3 (GPC3) của người vào dòng tế bào có nguồn gốc từ tế

bào ung thư phổi của chuột LLC1 [LL/2 (ký hiệu: LLC1), bộ phân chia: ATCC, số catalog: CRL-1642], được sử dụng. Chuột hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90 (con cái, 11 tuần tuổi) được mô tả ở trên trong mục (19-3-1) được sử dụng làm chuột. Dòng tế bào LLC1/OVA/GPC3 được duy trì và truyền trong môi trường RPMI1640 (Sigma-Aldrich, Co. LLC.) chứa 9,8% huyết tương bào thai bò (Sigma-Aldrich, Co. LLC.), 0,44 mg/mL G418 (Nacalai Tesque, Inc.), và 0,88 mg/mL Zeocin (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Dòng tế bào LLC1/OVA/GPC3 được cấy dưới da vào bụng chuột, và mô hình được coi là được hình thành khi thể tích khối u đạt khoảng 250-500 mm³. Sau khi mô hình được hình thành, chuột được cấy ghép dòng tế bào LLC1/OVA/GPC3 được phân nhóm và sau đó được sử dụng với tá được lỏng và các kháng thể kháng CD137 của người tương ứng.

(19-4-2) Điều chế và sử dụng được chất để sử dụng và đo khối u

A375-MY201aPh/B167-Lamlib hoặc A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, được chuẩn bị với liều được thể hiện trong Bảng 72 với PBS chứa 0,05% Tween-20, được sử dụng cho mô hình được cấy dòng tế bào LLC1/OVA/GPC3 vào ngày 11 và 14 sau khi cấy ghép khối u. PBS chứa 0,05% Tween-20 được sử dụng cho nhóm tá được lỏng. Chất lỏng đã chuẩn bị được sử dụng ở liều 10 mL/kg qua tĩnh mạch đuôi.

Phép đo tác dụng kháng u ở mô hình được cấy dòng tế bào LLC1/OVA/GPC3

Bảng 72

Nhóm	Số động vật	Dược chất	Liều	Phương pháp sử dụng	Ngày sử dụng
1	5	PBS chứa 0,05% Tween-20	-	Tĩnh mạch đuôi	Ngày 11 và Ngày 14 sau khi cấy ghép
2	5	A375-MY201aPh/B167-Lamlib	2,50 mg/kg	Tĩnh mạch đuôi	Ngày 11 và Ngày 14 sau khi cấy ghép
3	5	A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	2,50 mg/kg	Tĩnh mạch đuôi	Ngày 11 và Ngày 14 sau khi cấy ghép

Để đánh giá tác dụng kháng u, thể tích khối u được đo với tần suất 1 đến 2 lần mỗi tuần. Thể tích khối u được tính toán bằng phương trình sau.

Thể tích khối u (mm^3) = chiều dài (mm) x chiều rộng (mm) x chiều rộng (mm)/2

Kết quả là, các kết quả của Ví dụ (19-3-2) cho thấy rằng sự thay đổi nồng độ trong máu của chuột được dùng A375-SCF041aPh/B167-Lamlib là nhỏ hơn so với chuột được dùng A375-MY201aPh/B167-Lamlib; tuy nhiên, A375-SCF041aPh/B167-Lamlib bộc lộ tác dụng kháng u mạnh hơn so với A375-MY201aPh/B167-Lamlib (Fig. 90).

Dựa vào các kết quả nêu trên ở mô hình chuột, tác dụng kháng u của kháng thể kháng CD137 của người được gia tăng bằng cách đưa các cải biến axit amin mà làm tăng pI vào vùng hằng định chuỗi nặng.

Ví dụ 20: Sự tăng cường hoạt tính chủ vận bằng các kháng thể kháng CD3 của người được cải biến

Việc gia tăng hoạt tính chủ vận của kháng thể kháng CD3 bằng cách kết hợp các cải biến axit amin để làm tăng pI và vùng hằng định chuỗi nặng với hoạt tính liên kết tăng đối với Fc γ RIIb được đánh giá.

SCF057aPh được sử dụng, được tạo ra bằng cách đưa cải biến axit amin Q311R/P343R để làm tăng pI vào MY201aPh và MY201aPh, là các vùng hằng định chuỗi nặng có hoạt tính liên kết tăng đối với Fc γ RIIb được tạo ra trong Ví dụ 7-1. Hơn nữa, đối với vùng hằng định của IgG người tự nhiên, G1T6 (SEQ ID NO: 223) được sử dụng. Các kháng thể kháng CD3 của người tương ứng được tạo ra bằng cách sử dụng TR01H113 (SEQ ID NO: 224) làm vùng biến đổi chuỗi nặng; MY201aPh, SCF057aPh, hoặc G1T6 làm vùng hằng định chuỗi nặng; và L0011-k0 (SEQ ID NO: 225) làm chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng CD3 của người. IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0 được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm.

Thử nghiệm sinh học hoạt hóa tế bào T (NFAT) (Promega, CS176401) được sử dụng để đo hoạt tính *in vitro* của các kháng thể được tạo ra. Mỗi giếng của đĩa 96 giếng được bổ sung vào 200 μL tế bào Fc γ RIIB CHO-K1 (Promega) được điều chế ở nồng độ $5 \times 10^4/\text{mL}$ với môi trường nuôi cấy được bổ sung, và đĩa được để yên qua đêm trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C. Môi trường nuôi cấy CHO (90% Ham's F12, 10% FBS) được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Tiếp theo, toàn bộ môi trường nuôi cấy được loại bỏ bằng cách hút, và sau đó 25 μL tế bào NFAT-RE-Luc2 được điều chế ở $2 \times 10^6/\text{mL}$ với môi trường thử nghiệm (99% RPMI, 1%

FBS) được bổ sung vào mỗi giếng. Tiếp theo, 25 μ L mỗi dung dịch kháng thể được pha loãng bằng môi trường thử nghiệm được bổ sung ở nồng độ cuối cùng là 0, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, và 10 μ g/mL. Đĩa được để yên trong 6 giờ trong thiết bị ủ 5% CO₂ ở 37°C, và sau đó để yên trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, và 75 μ L của thuốc thử Bio-Glo được bổ sung vào mỗi giếng. Hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferaza (Hệ đệm và Chất nền) được sử dụng cho thuốc thử Bio-Glo. Sau đó, đơn vị sáng tương đối của mỗi giếng được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa. Giá trị độ phát quang của mỗi giếng chia cho giá trị độ phát quang của giếng không thêm kháng thể được xác định là “đơn vị sáng tương đối”, và đóng vai trò là chỉ số đánh giá hoạt tính chủ vận CD3 của mỗi kháng thể.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 91. So với TR01H113-G1T6/L0011-k0 có vùng hằng định của IgG1 người tự nhiên, TR01H113-MY201aPh/L0011-k0 có khả năng liên kết với Fc γ RIIb được tăng cường thể hiện hoạt tính chủ vận CD3 cao hơn. TR01H113-SCF057aPh/L0011-k0 được đưa vào với các cải biến axit amin mà làm tăng pI thể hiện hoạt tính chủ vận CD3 cao hơn so với TR01H113-MY201aPh/L0011-k0 trước khi các cải biến axit amin được đưa vào.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Các phân tử liên kết kháng nguyên kháng CD137 đã bộc lộ và phương pháp sử dụng chúng áp dụng được cho việc phát triển, sản xuất, cung cấp và sử dụng được phẩm có tác dụng hoạt hóa tế bào miễn dịch, tác dụng gây độc tế bào hoặc tác dụng kháng u, nhưng có hiệu quả thấp đối với các mô không phải khối u chẳng hạn như các mô bình thường và ít tác dụng phụ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD137 chứa tổ hợp bất kỳ của HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 được chọn từ các mục (a) đến (i) dưới đây:

(a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(b) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 9, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(c) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 22, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(d) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(e) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 12, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 28;

(f) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 21, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 29;

(g) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(h) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27;

(i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, HVR-H2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, HVR-H3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19, HVR-L1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, HVR-L2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

2. Kháng thể kháng CD137 theo điểm 1 chứa tổ hợp bất kỳ của VH và VL được chọn từ các mục (a) đến (i) dưới đây:

(a) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;

(b) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 44 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 55;

(c) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 45 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 55;

(d) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 46 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 54;

(e) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 48 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 56;

(f) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 49 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 57;

(g) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 51 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59;

(h) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 51 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 60; và

(i) VH chứa trình tự axit amin có SEQ ID No: 50 và VL chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 59.

3. Kháng thể kháng CD137 theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể người, kháng thể được làm tương thích với người, hoặc kháng thể khảm, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó.
4. Kháng thể kháng CD137 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 64 đến 85.
5. Axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể kháng CD137 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
6. Vector trong đó axit nucleic theo điểm 5 được đưa vào.
7. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 5 hoặc vector theo điểm 6.
8. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng CD137, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 7 sao cho kháng thể kháng CD137 được sản xuất.
9. Thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng CD137 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và chất gây độc tế bào.

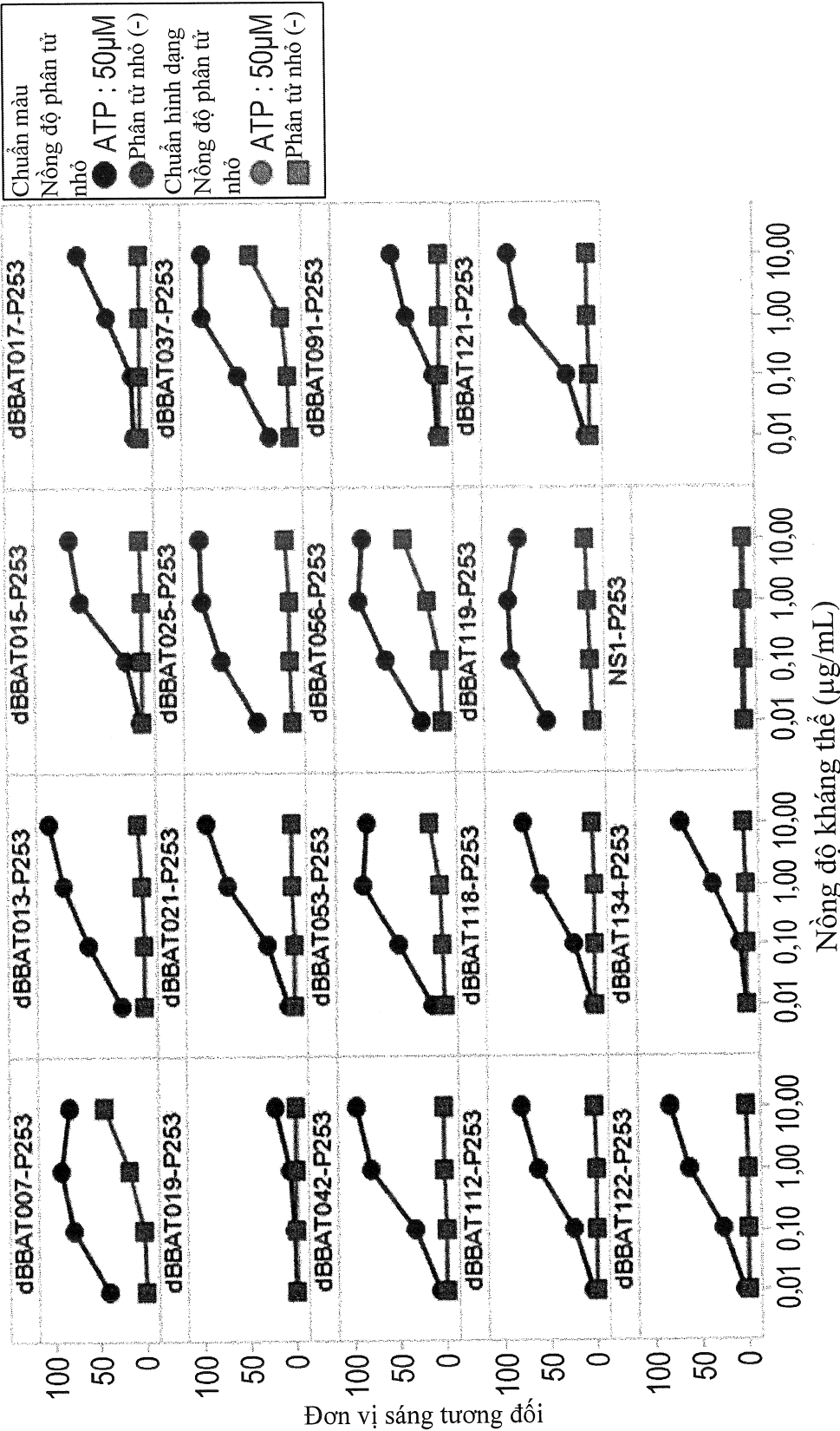


FIG. 1

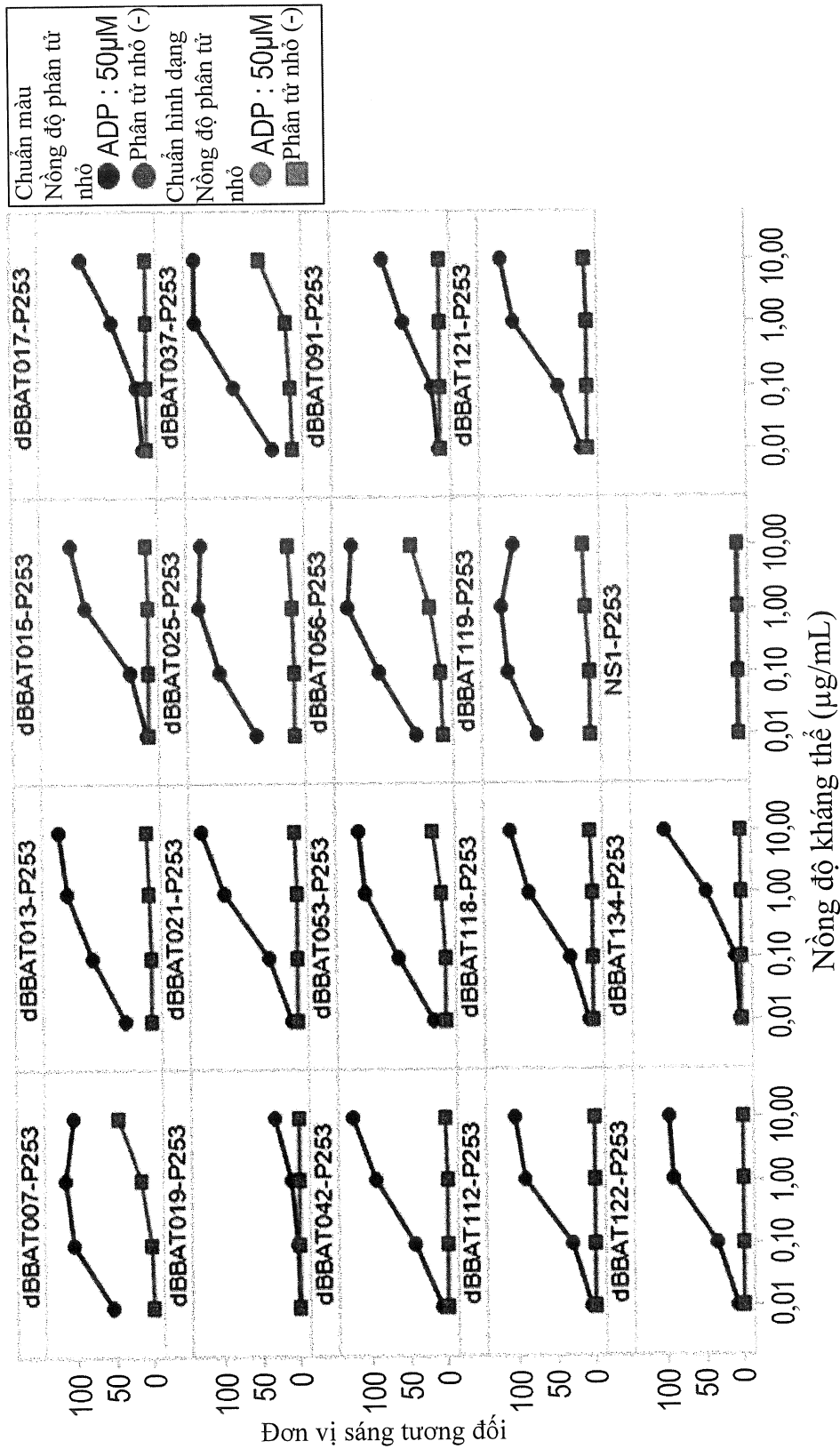


FIG. 2

3/91

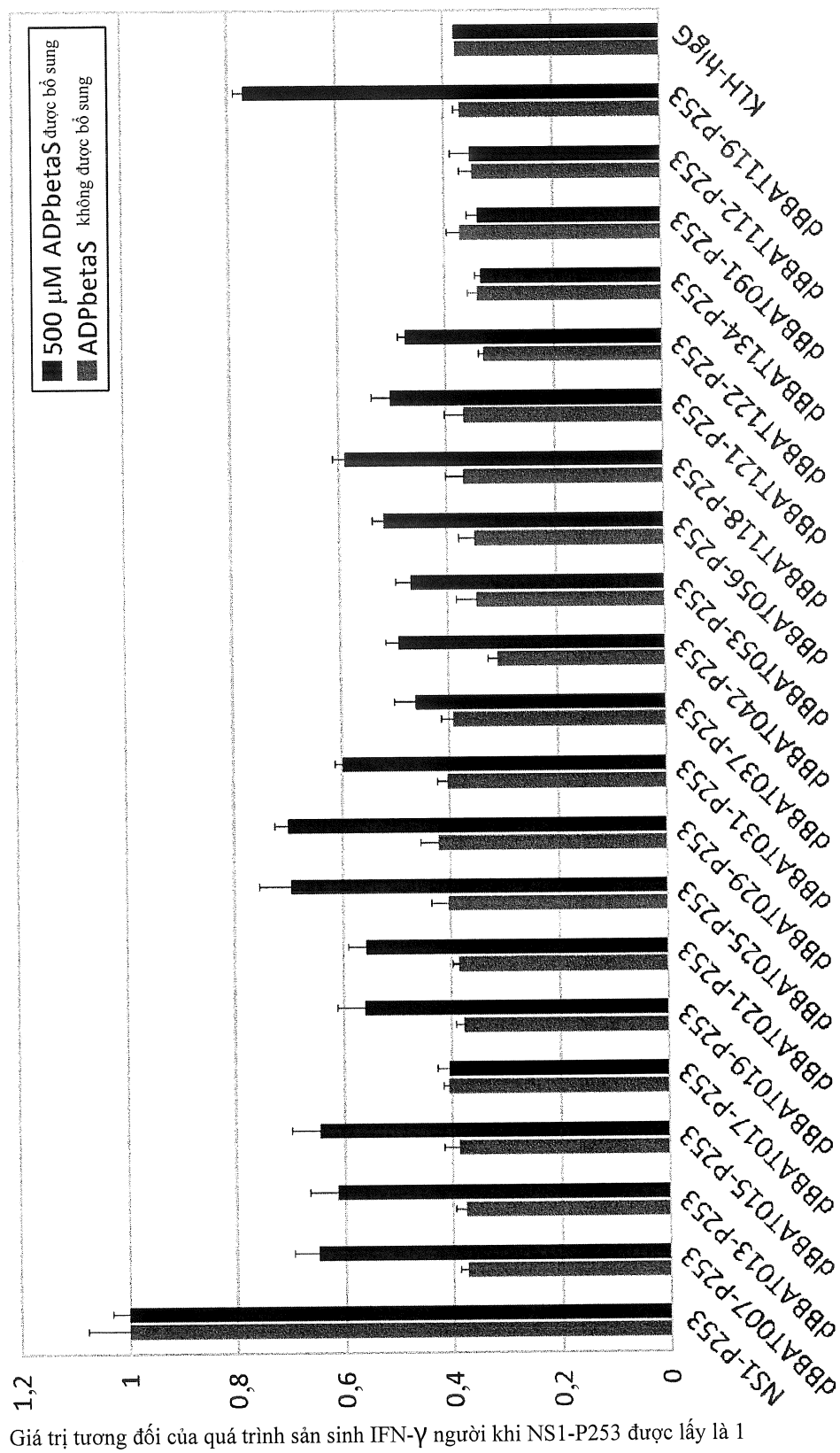


FIG. 3

4/91

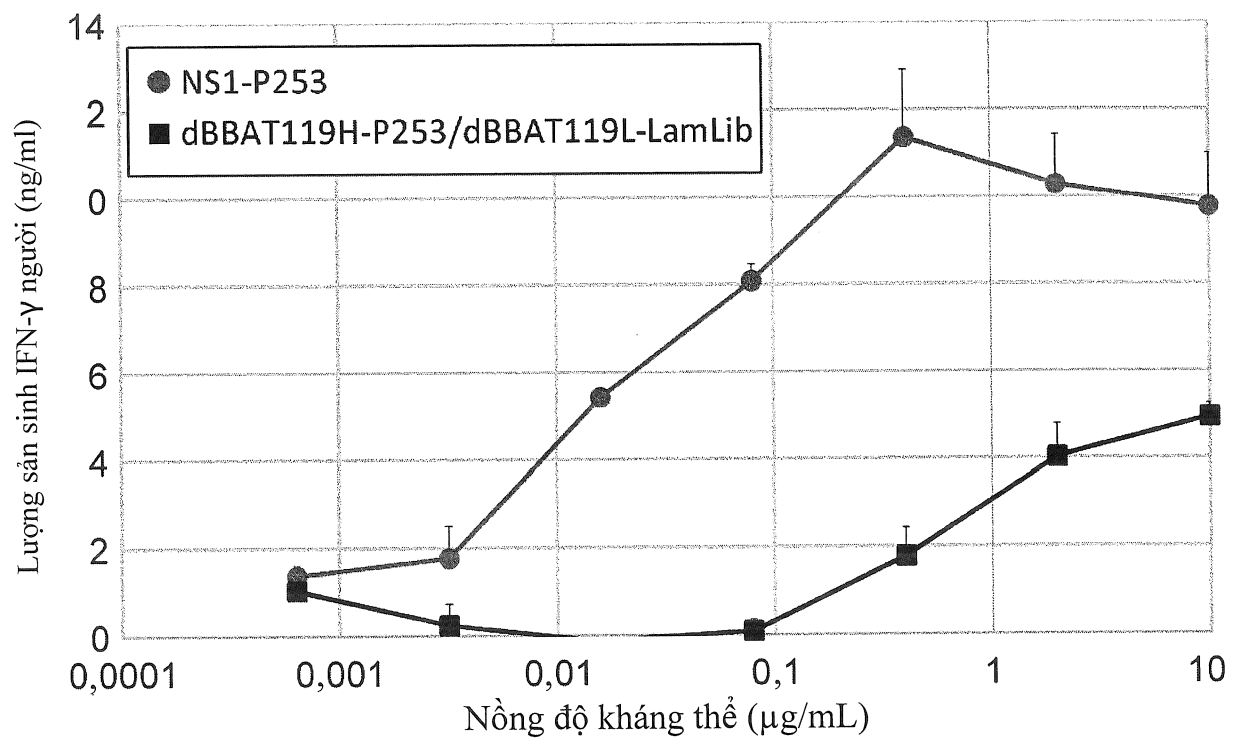


FIG. 4

5/91

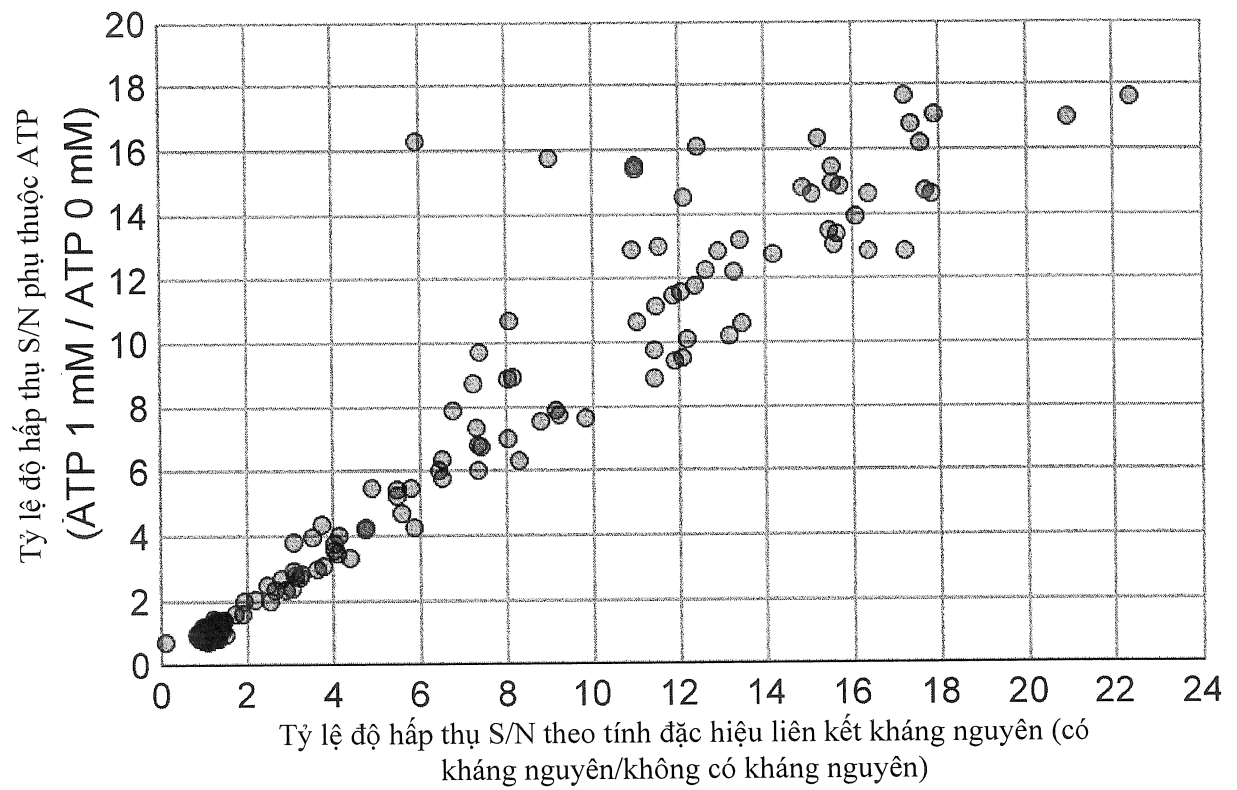


FIG. 5

6/91

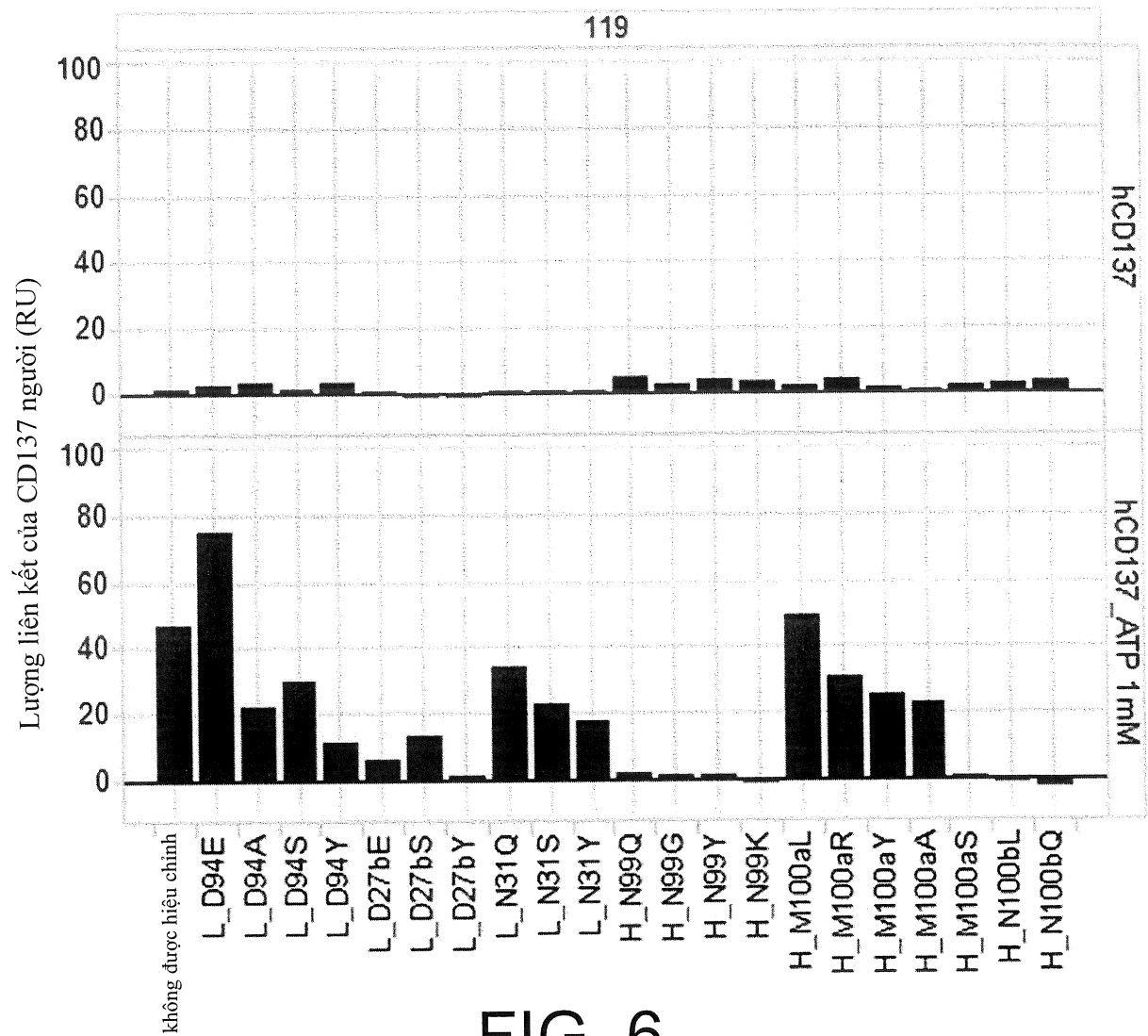


FIG. 6

7/91

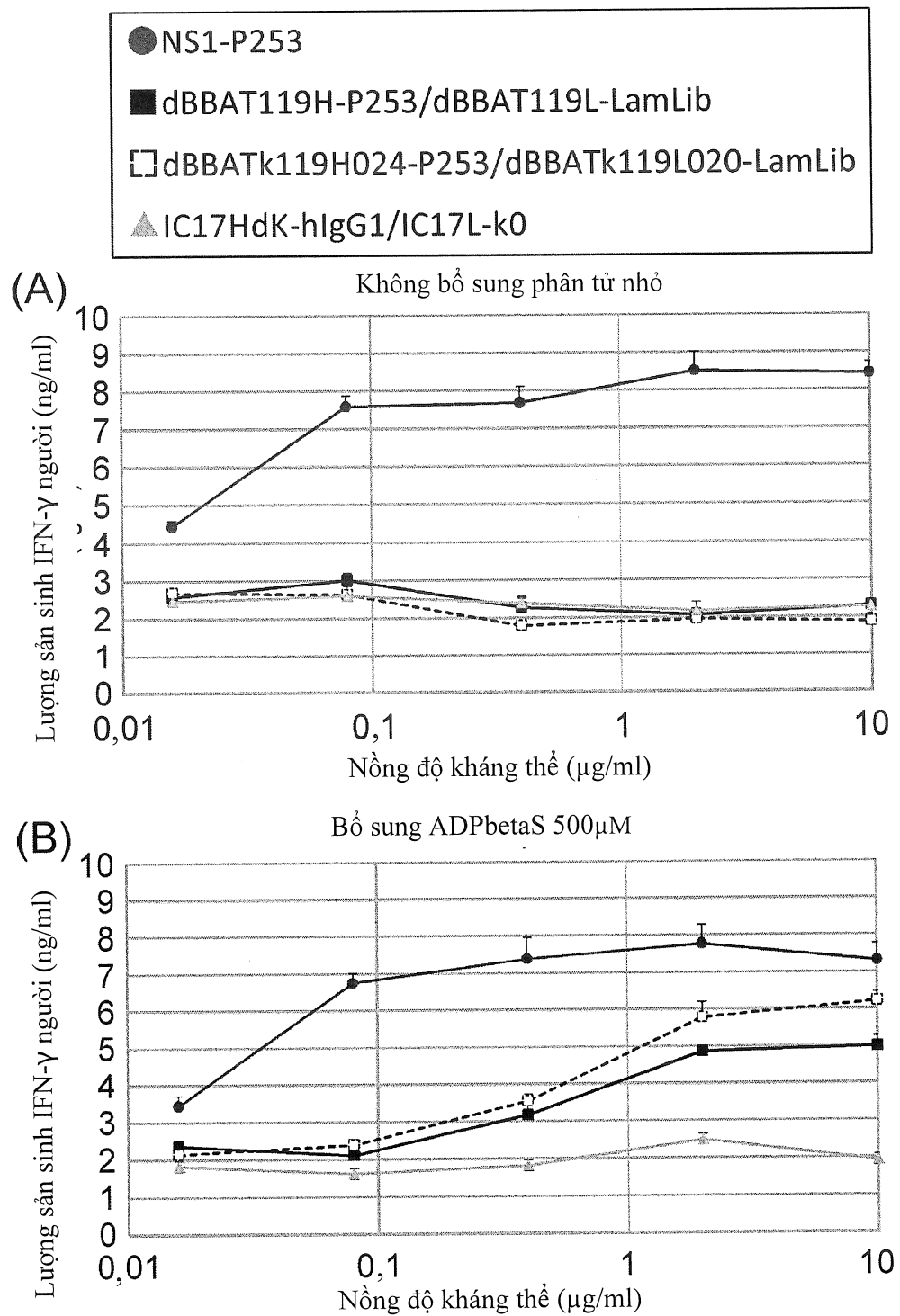


FIG. 7

8/91

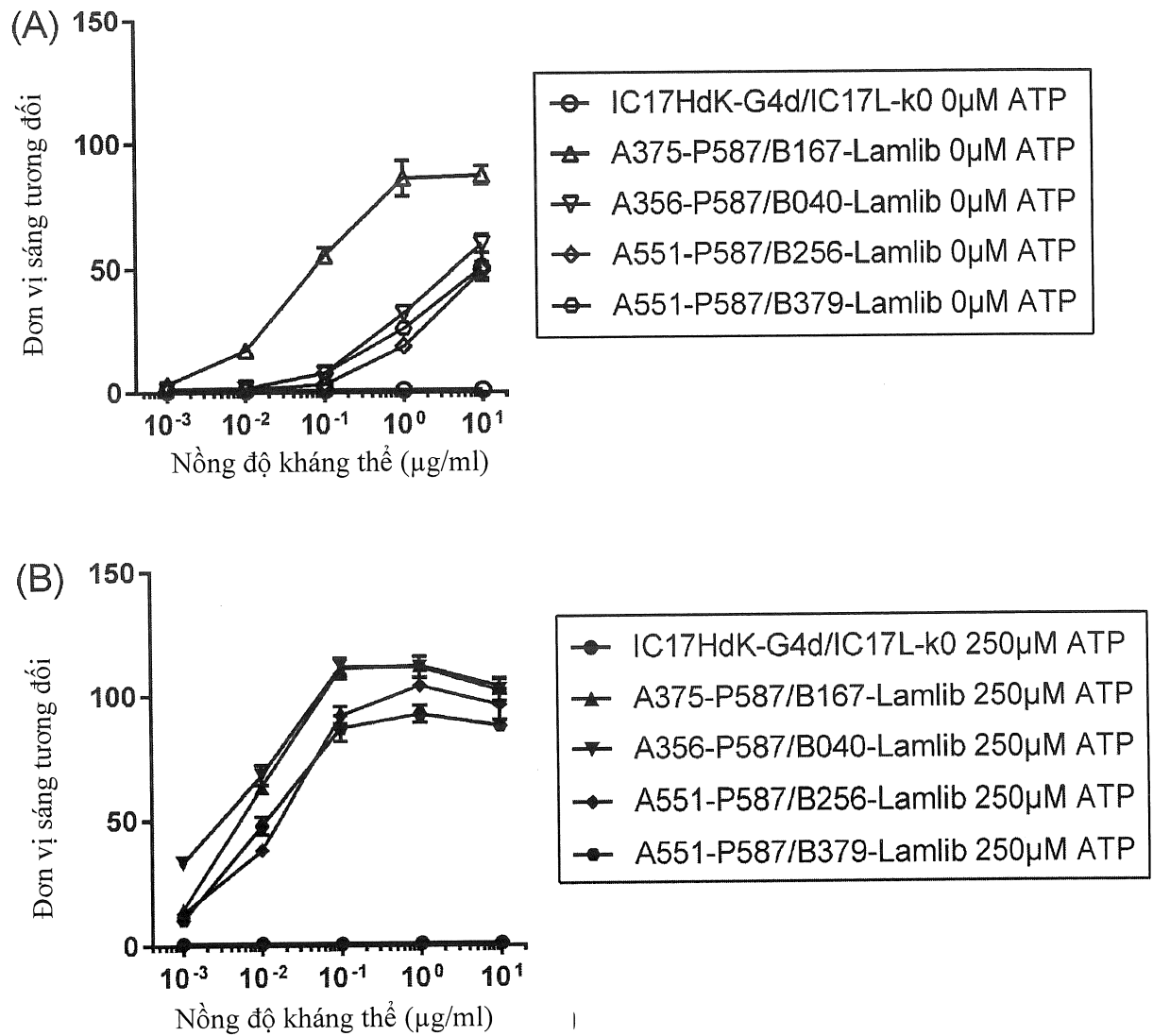


FIG. 8

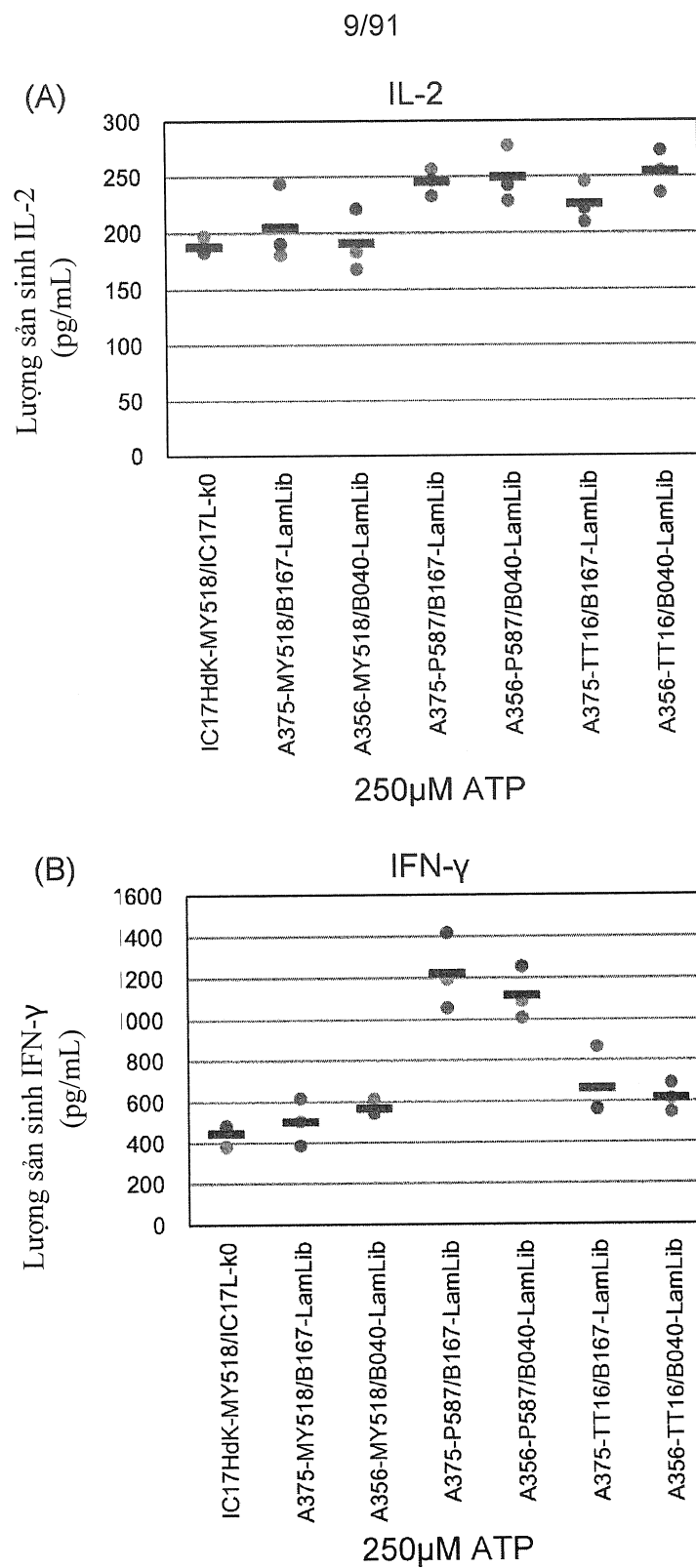


FIG. 9

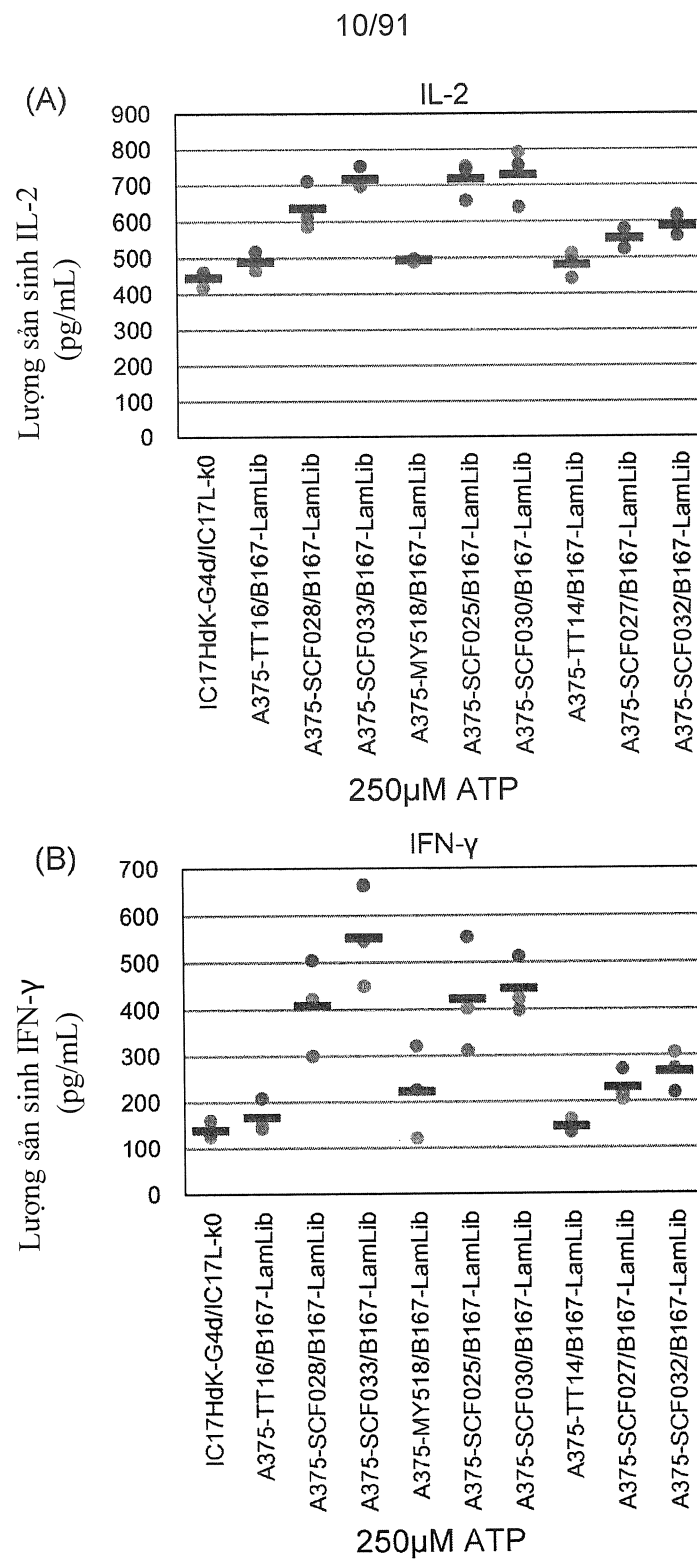


FIG. 10

11/91

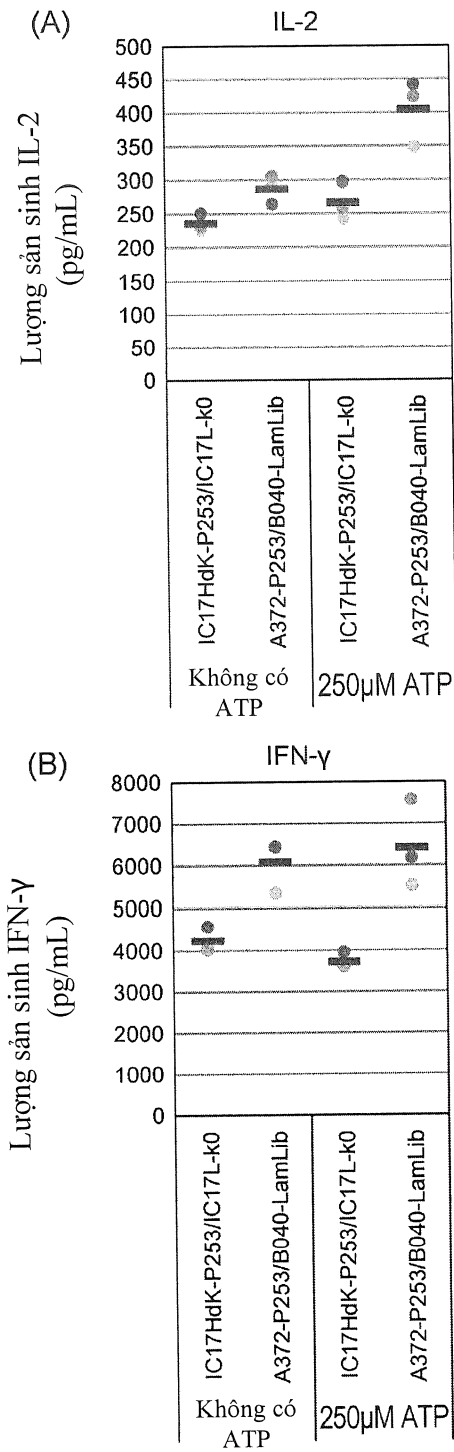


FIG. 11

12/91

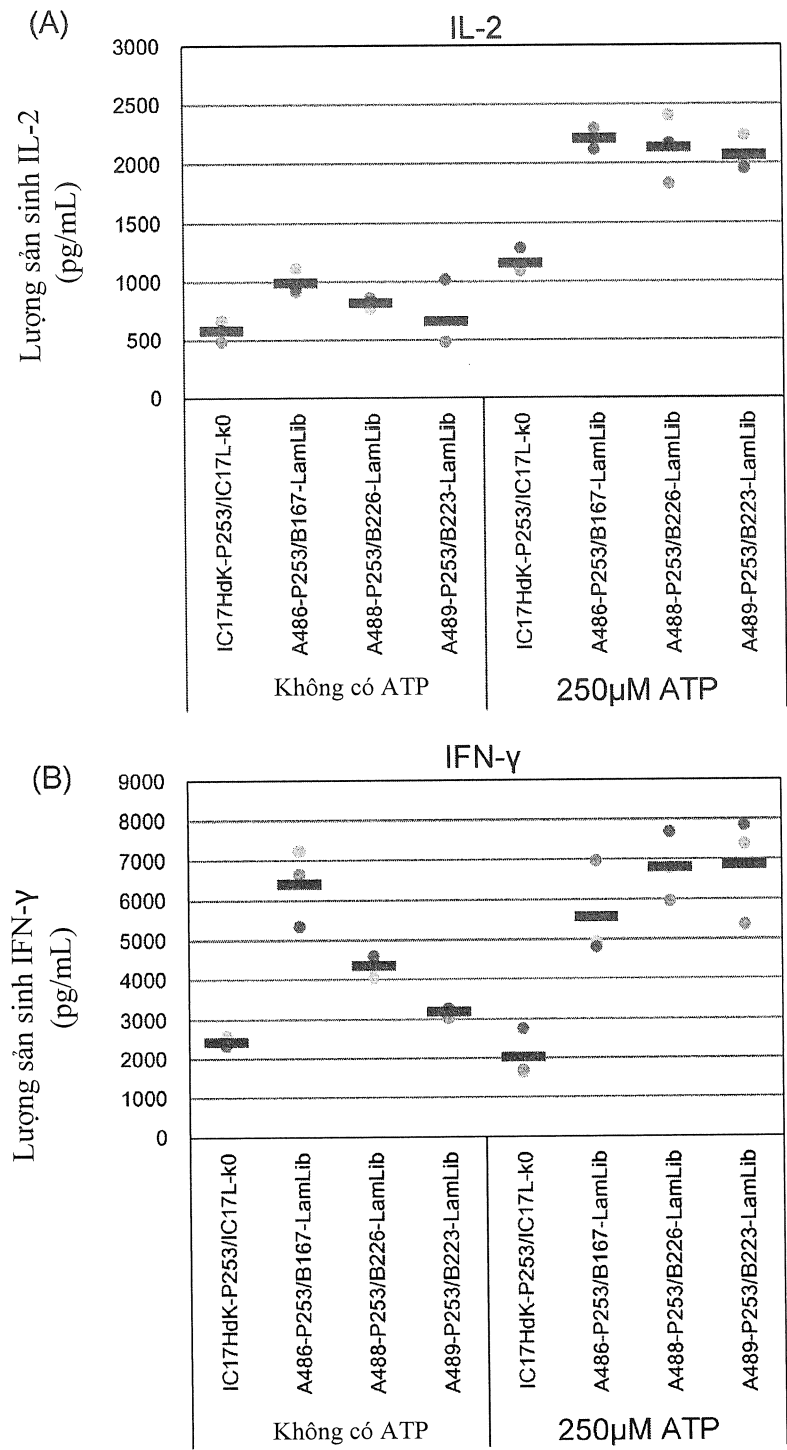


FIG. 12

13/91

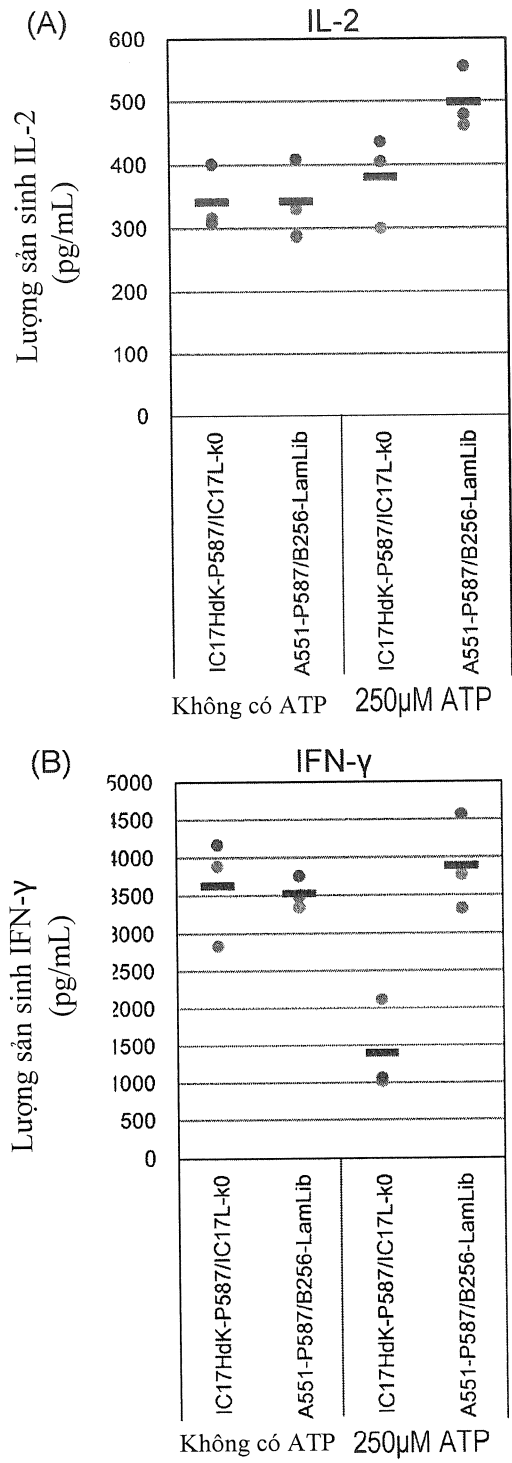


FIG. 13

14/91

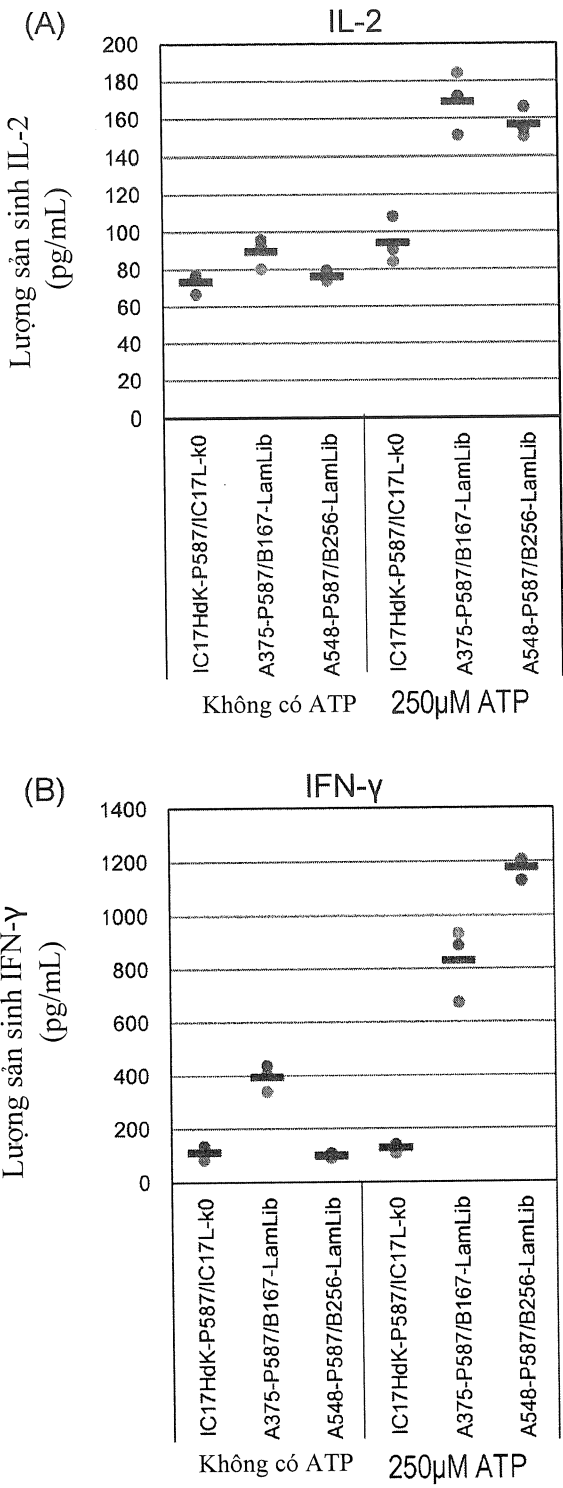


FIG. 14

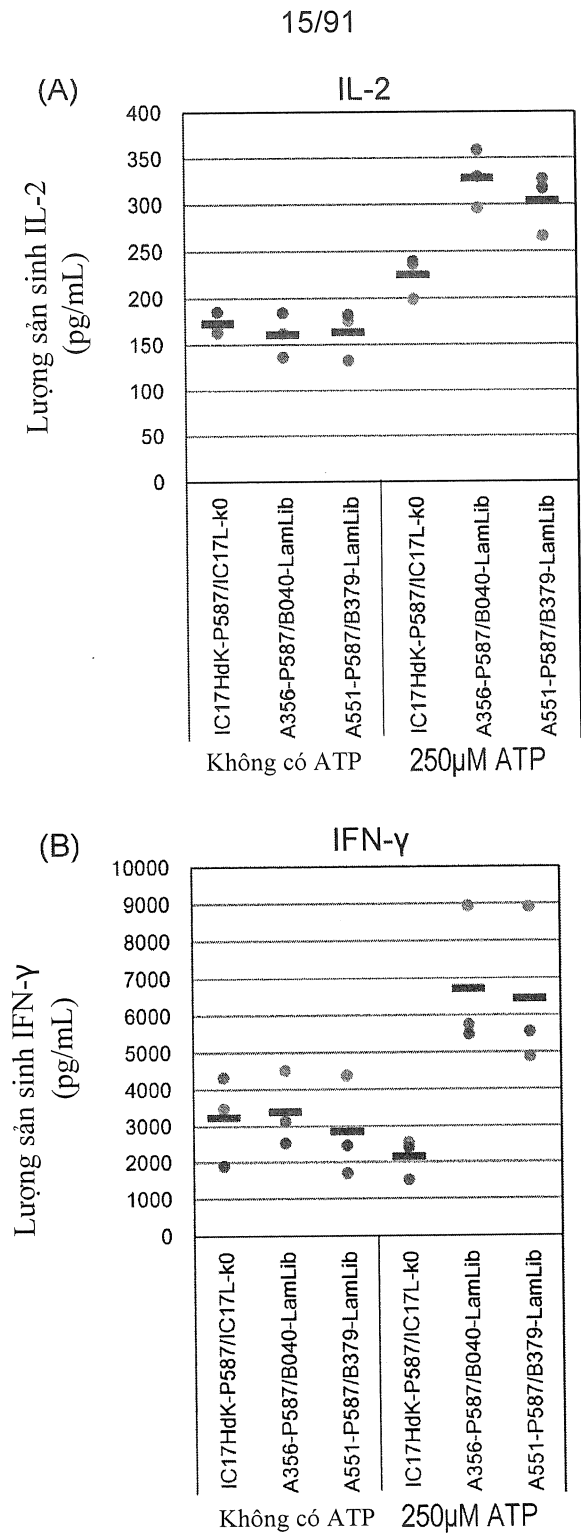


FIG. 15

16/91

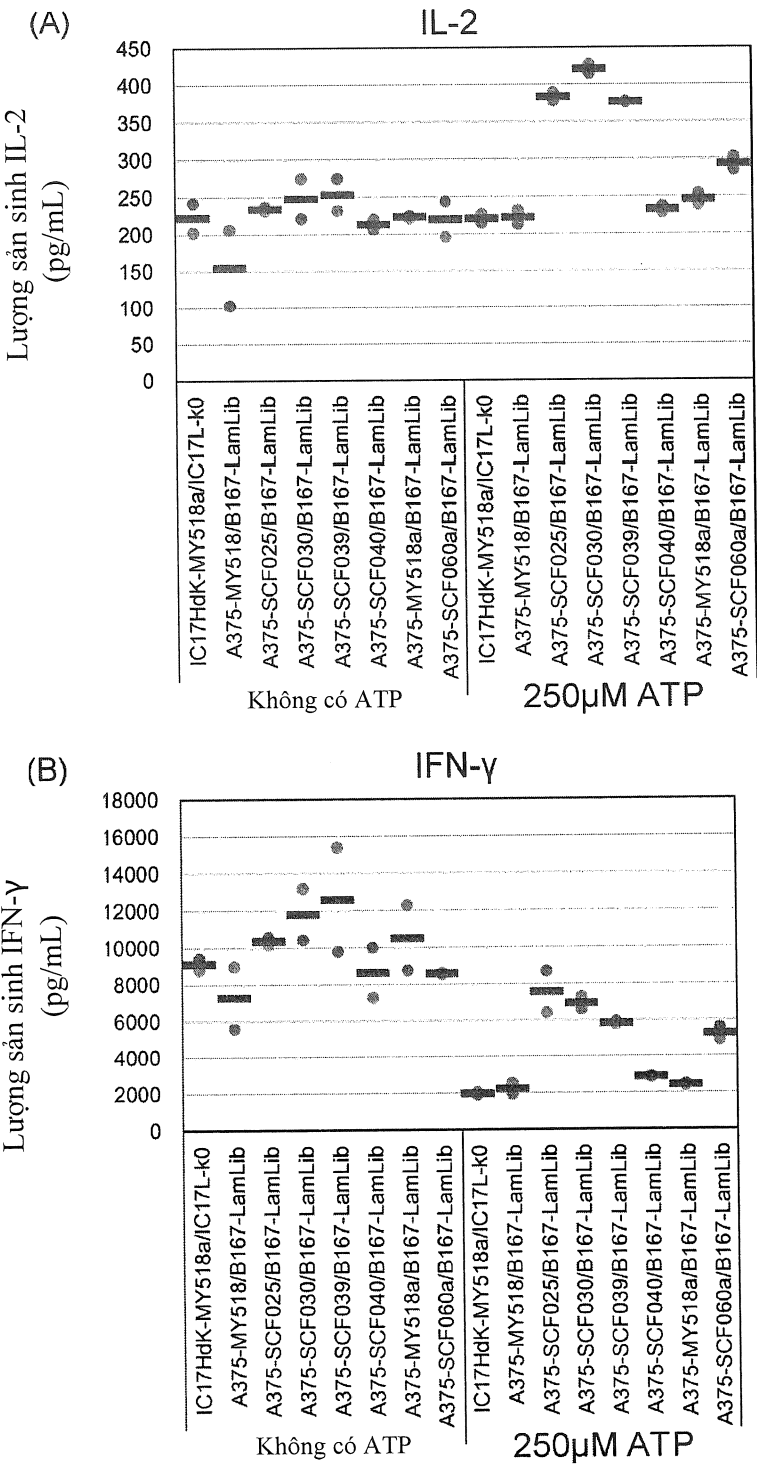


FIG. 16

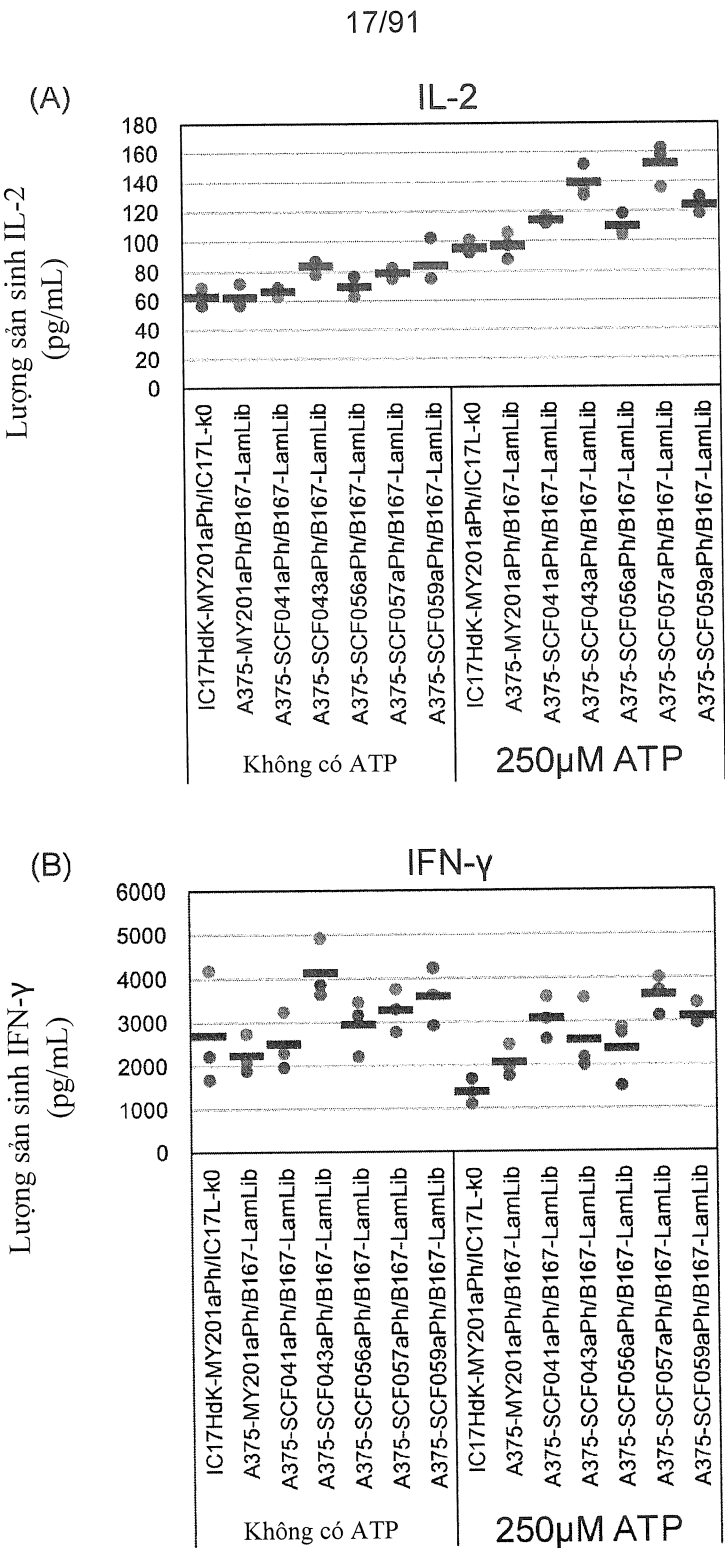


FIG. 17

18/91

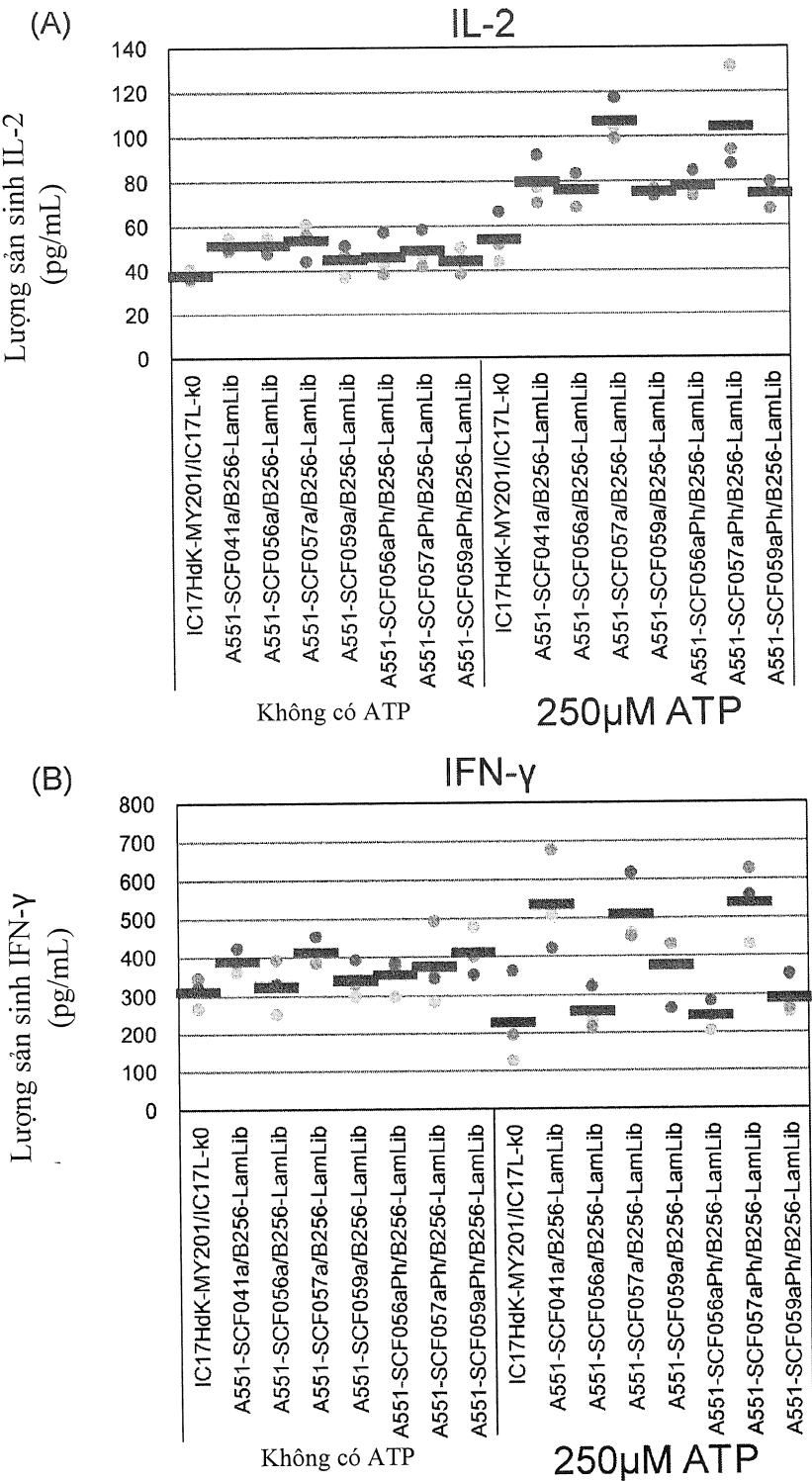


FIG. 18

19/91

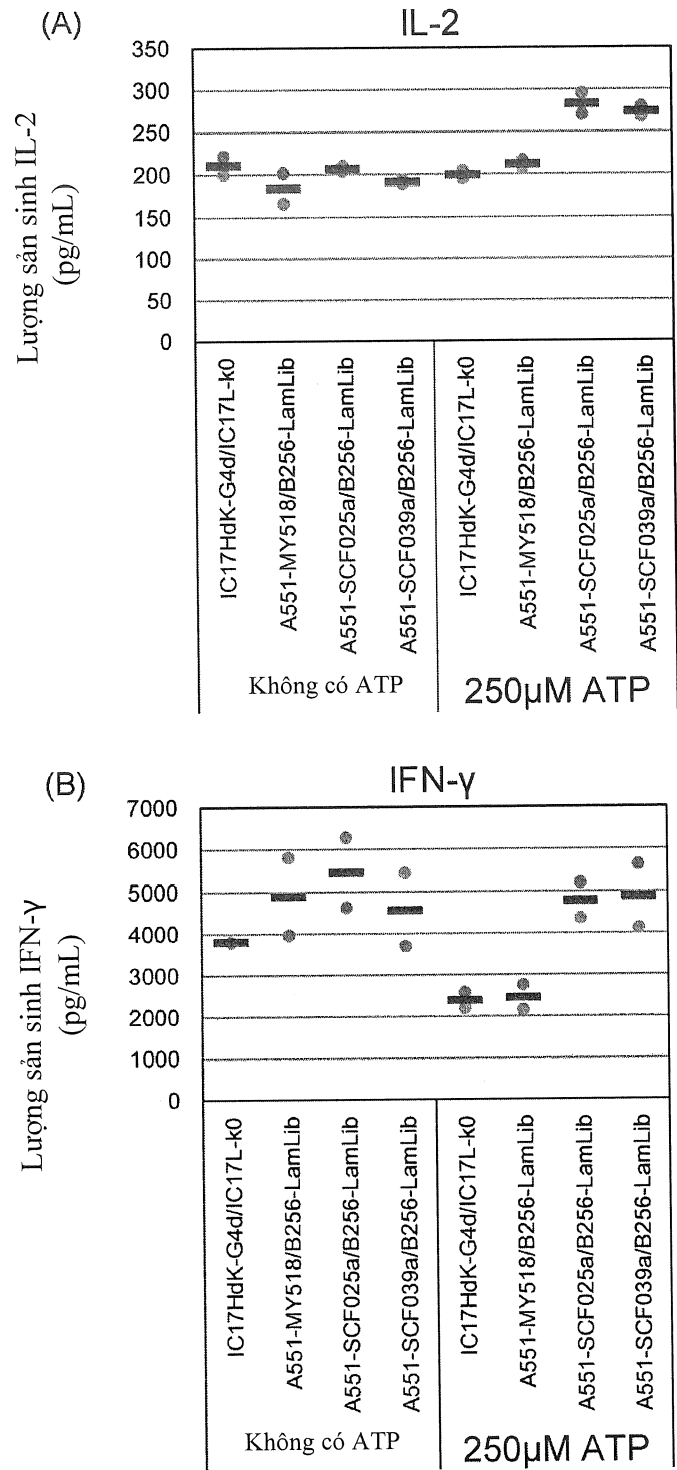


FIG. 19

20/91

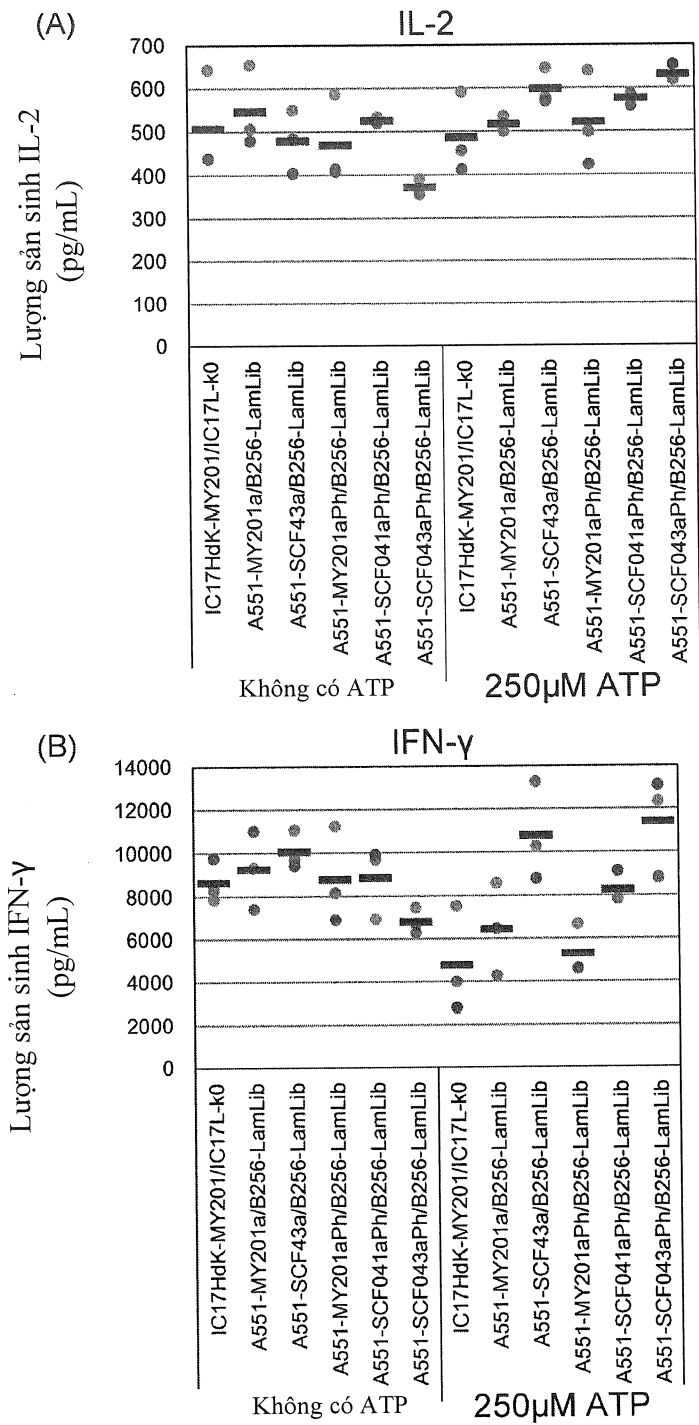


FIG. 20

21/91

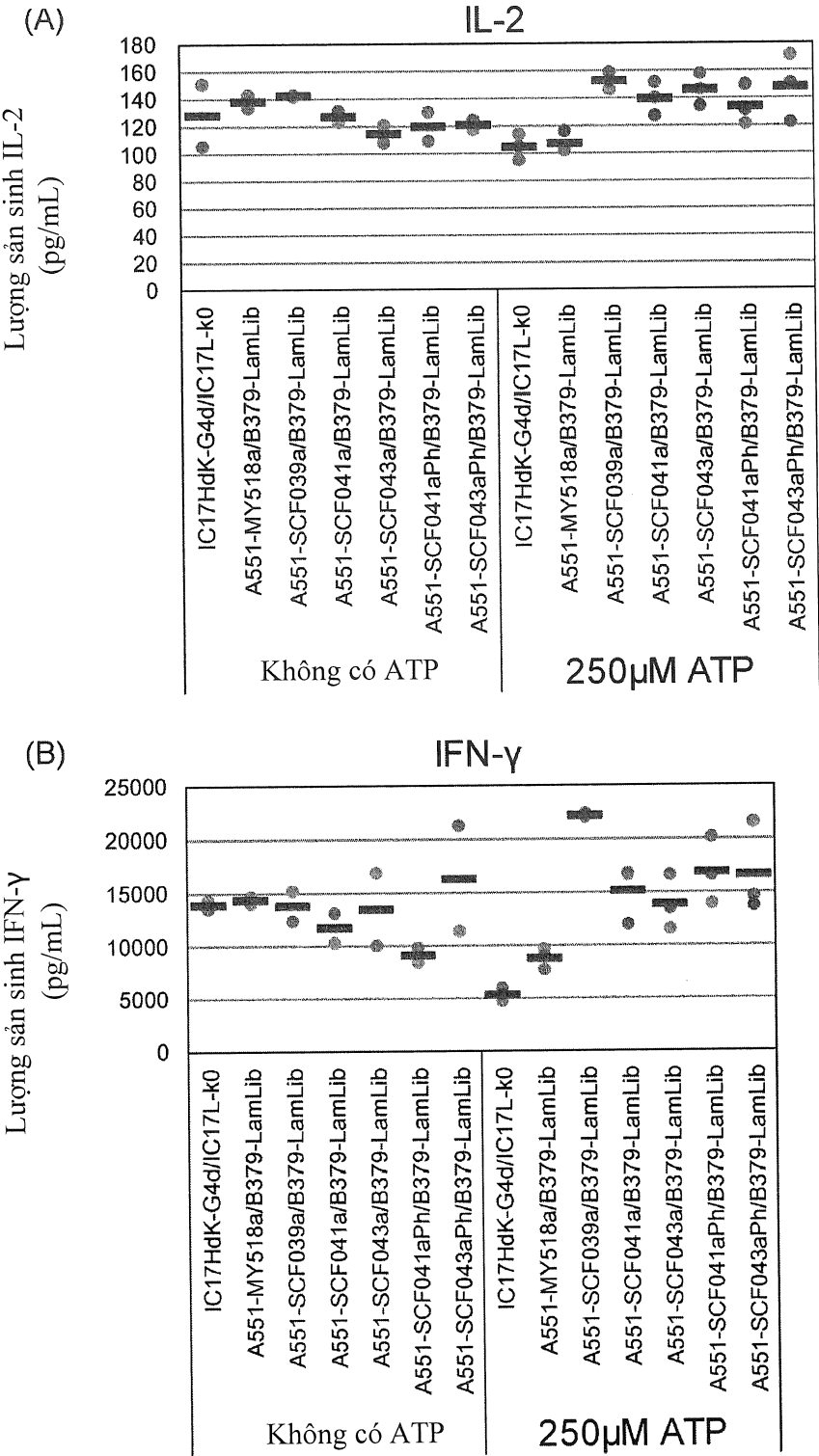


FIG. 21

22/91

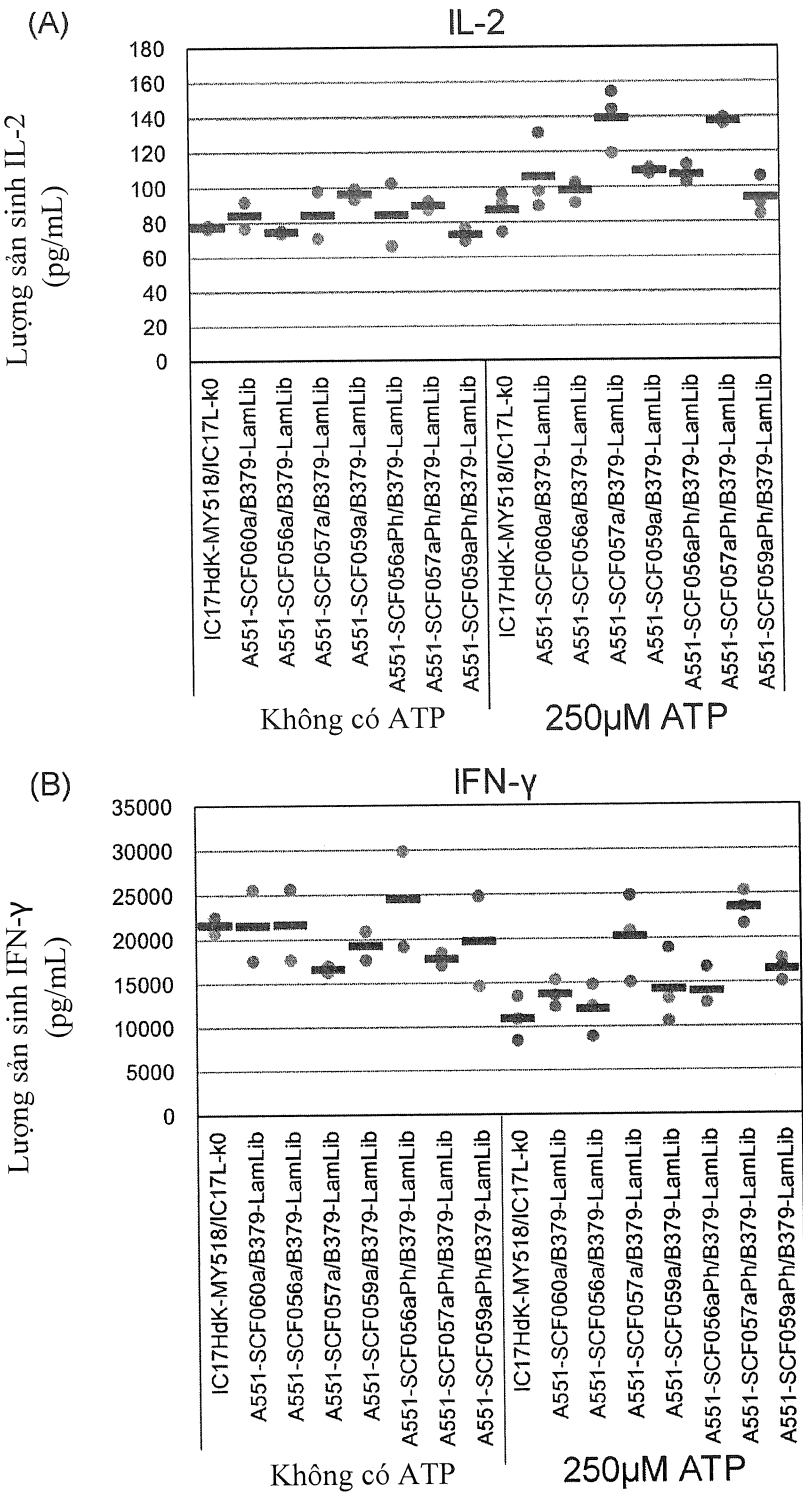


FIG. 22

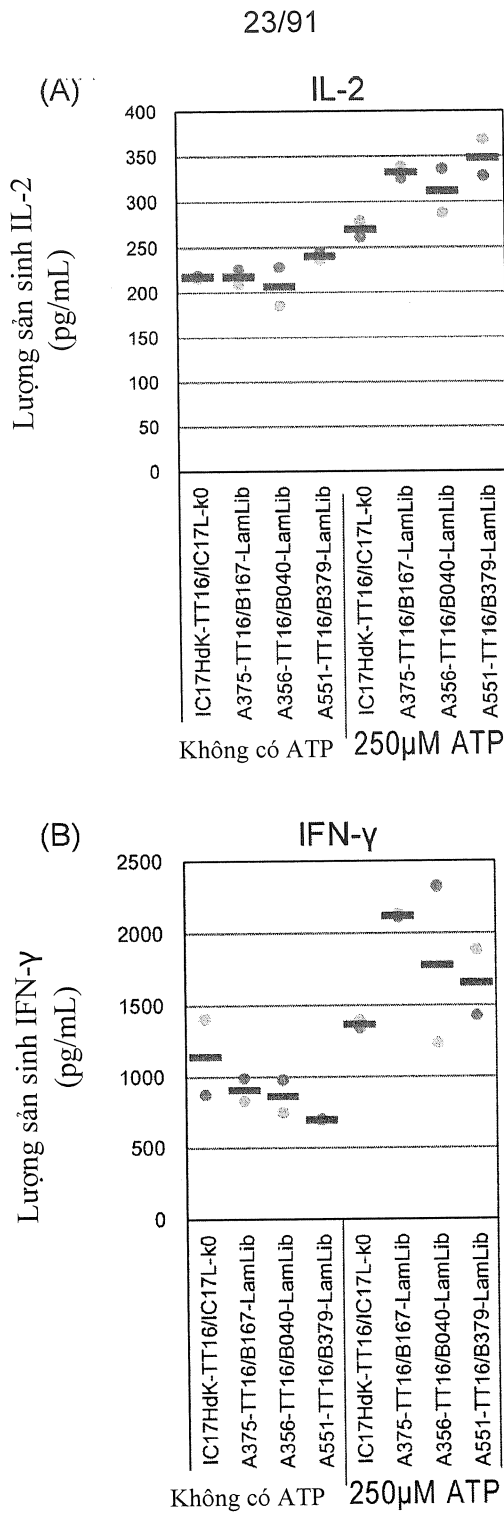


FIG. 23

24/91

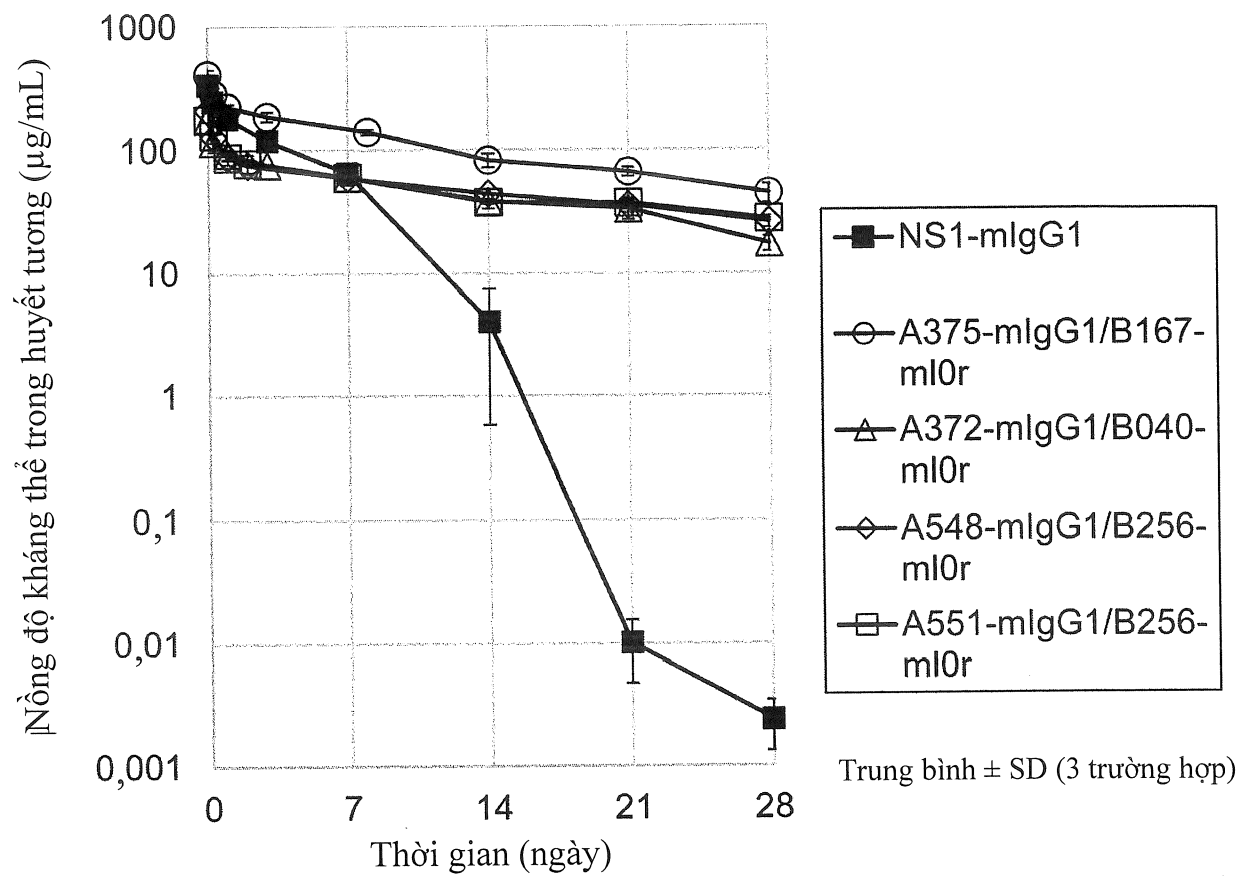


FIG. 24

25/91

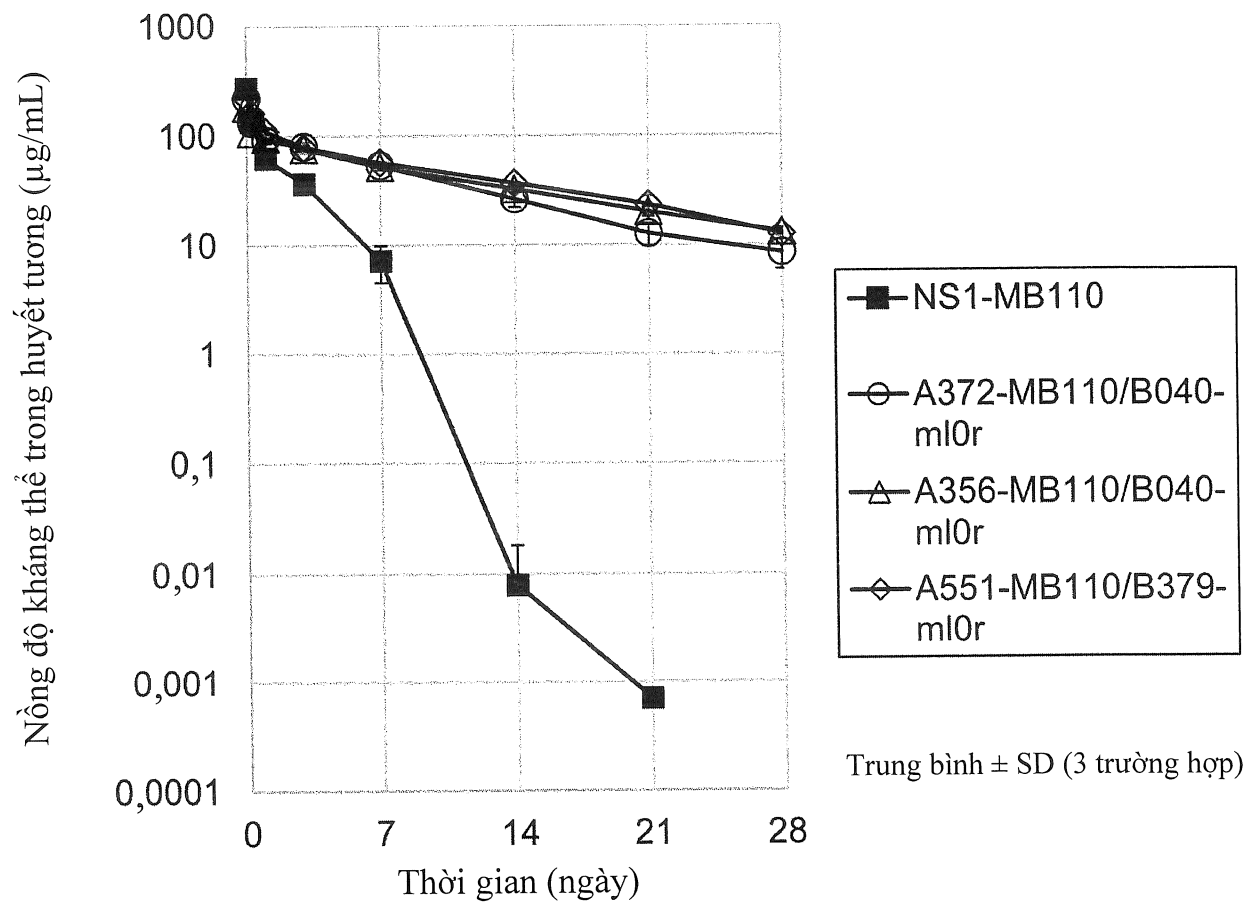


FIG. 25

26/91

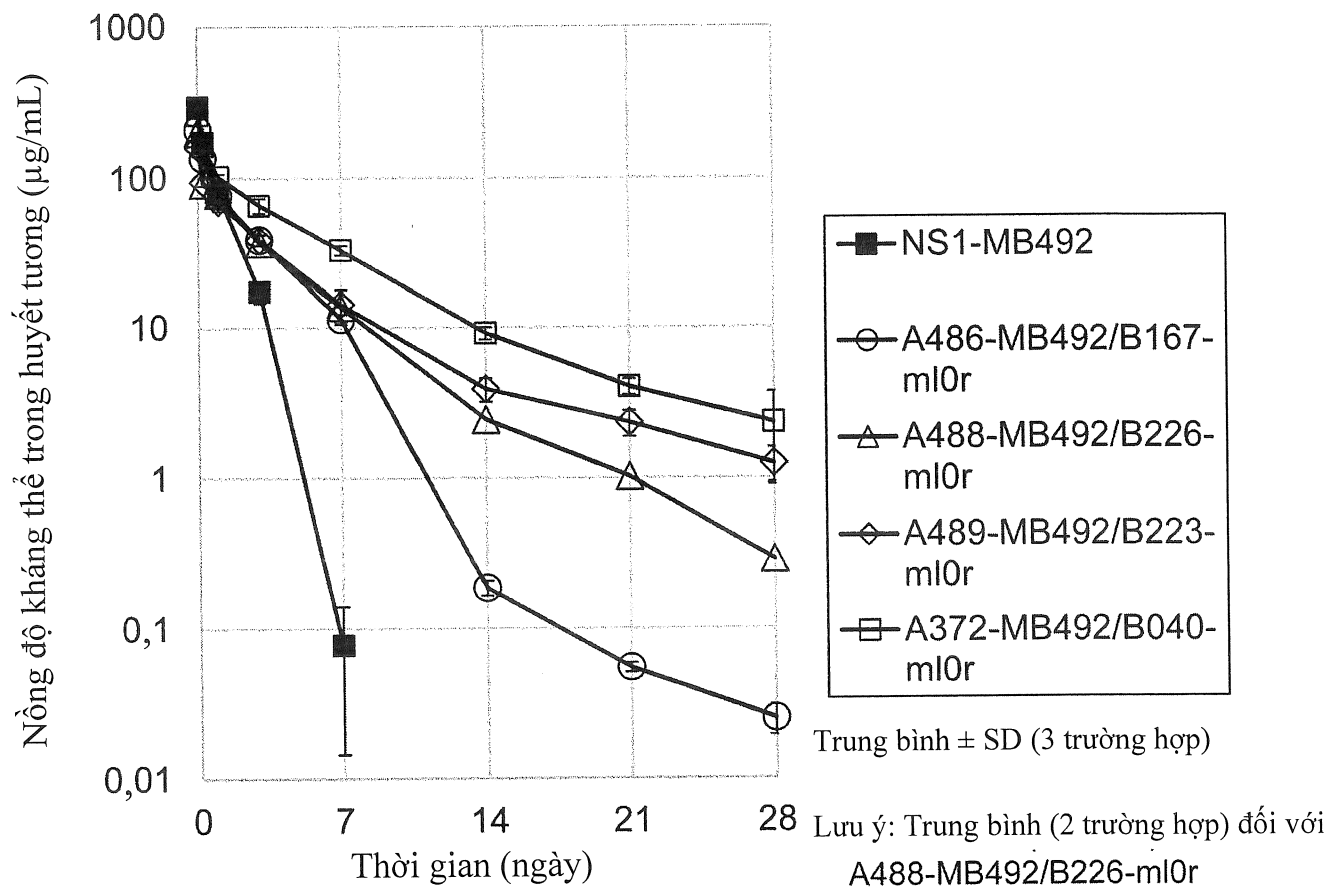


FIG. 26

27/91

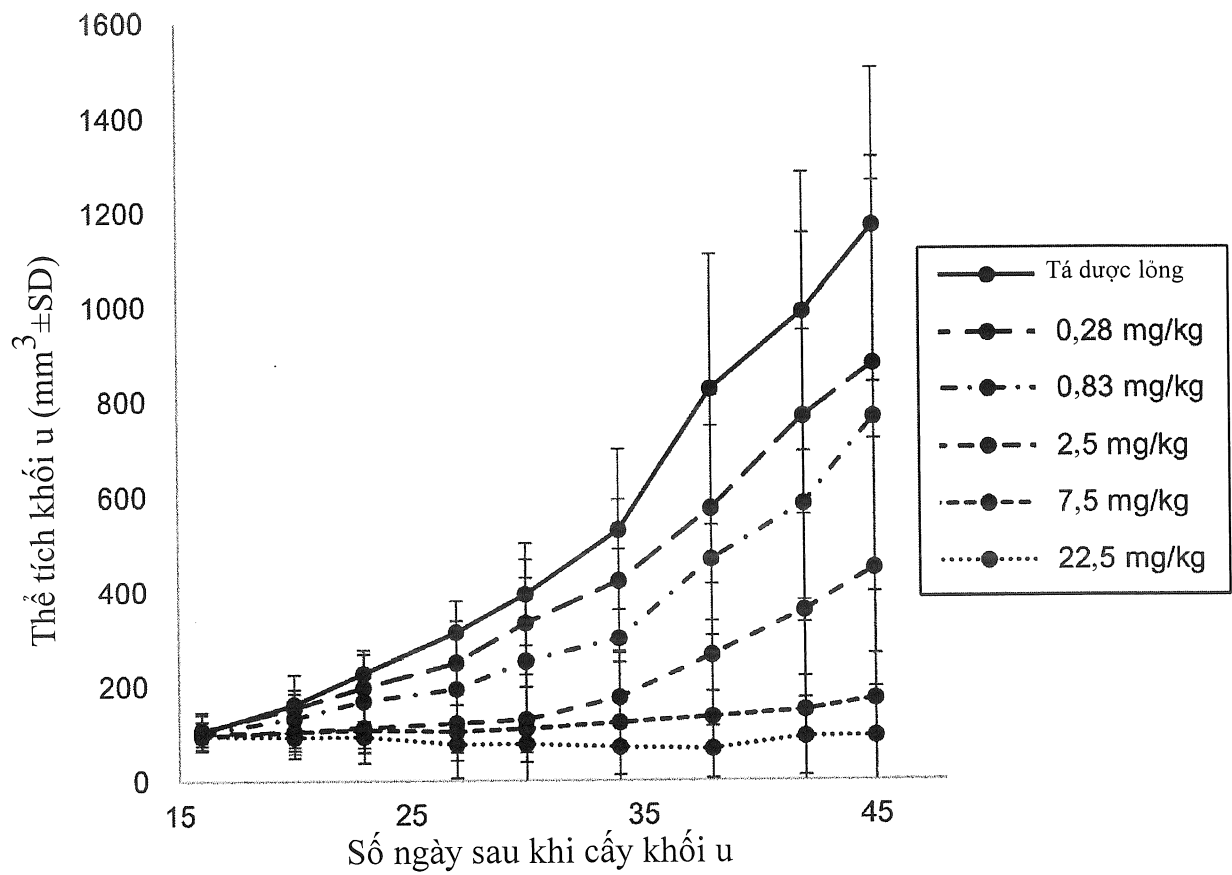


FIG. 27

28/91

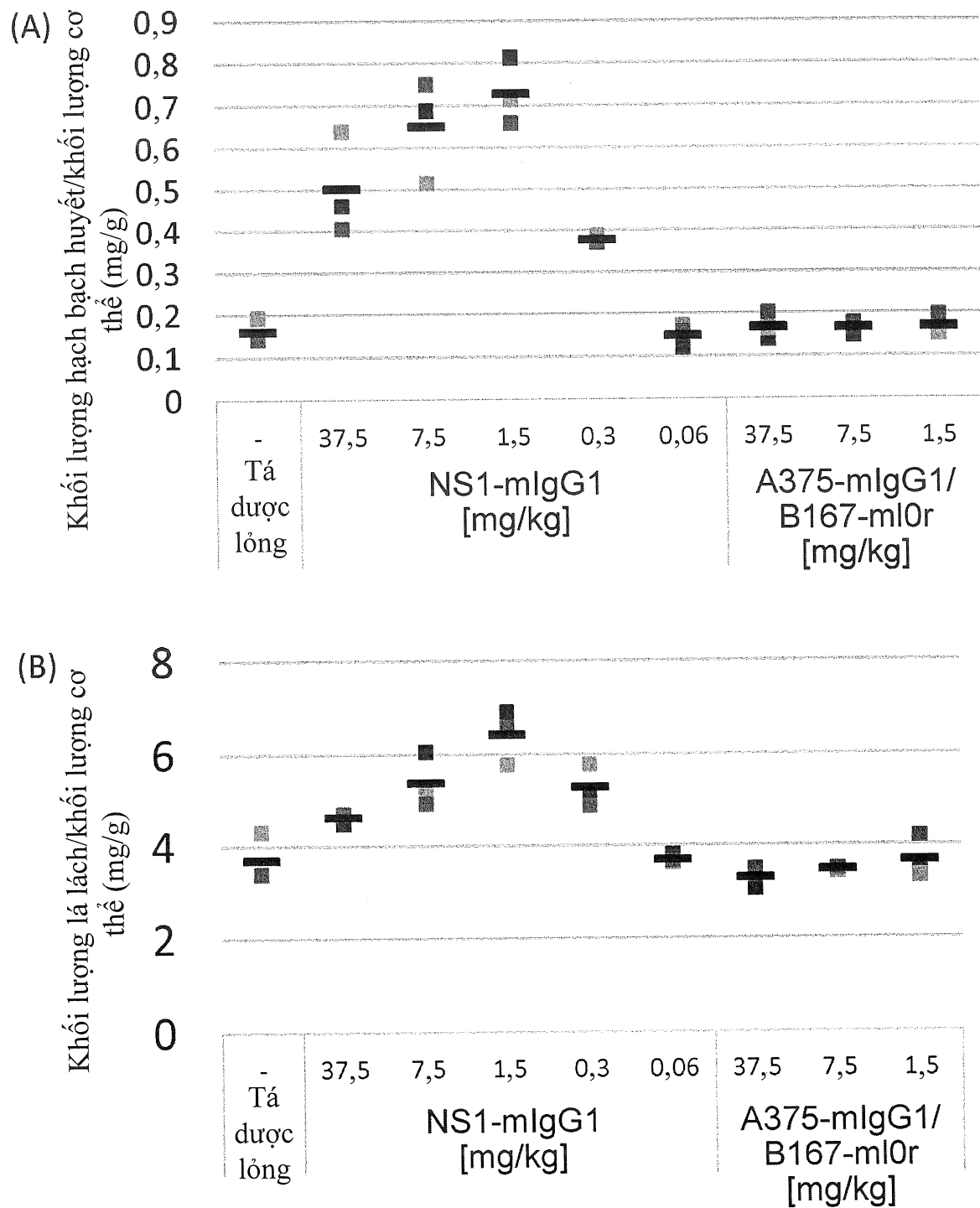


FIG. 28

29/91

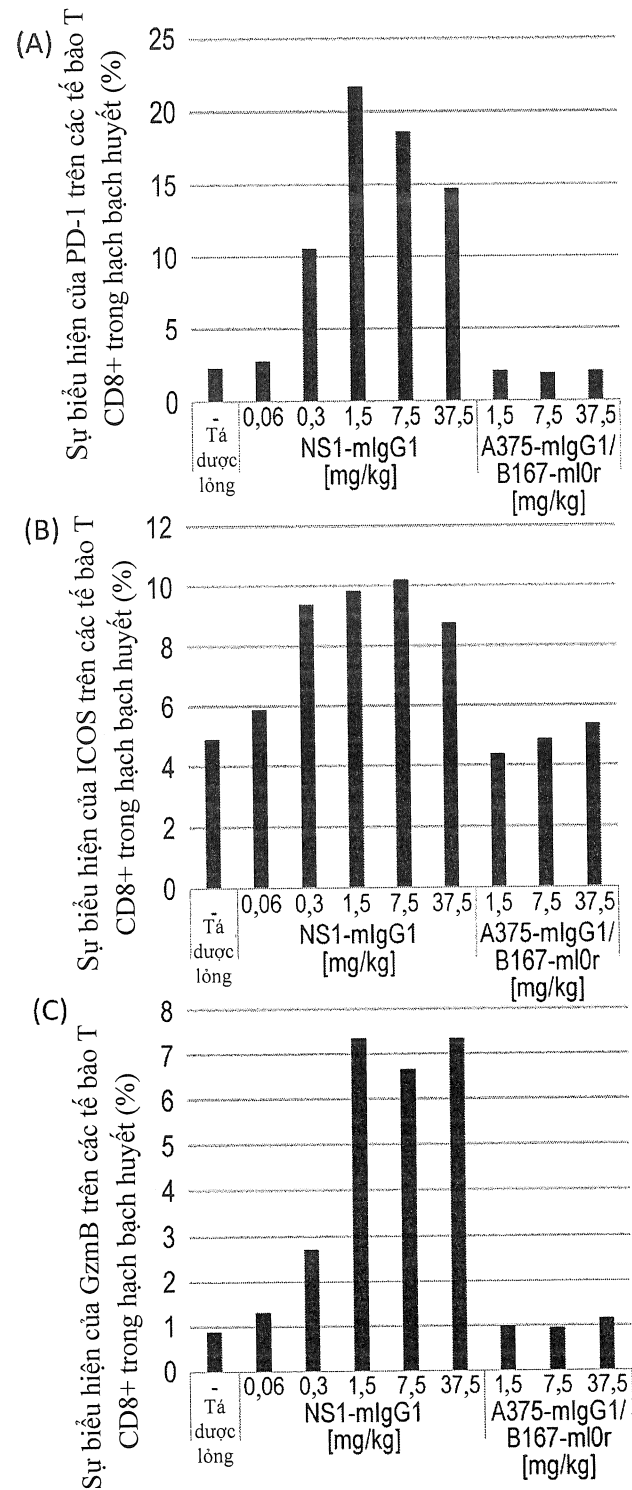


FIG. 29

30/91

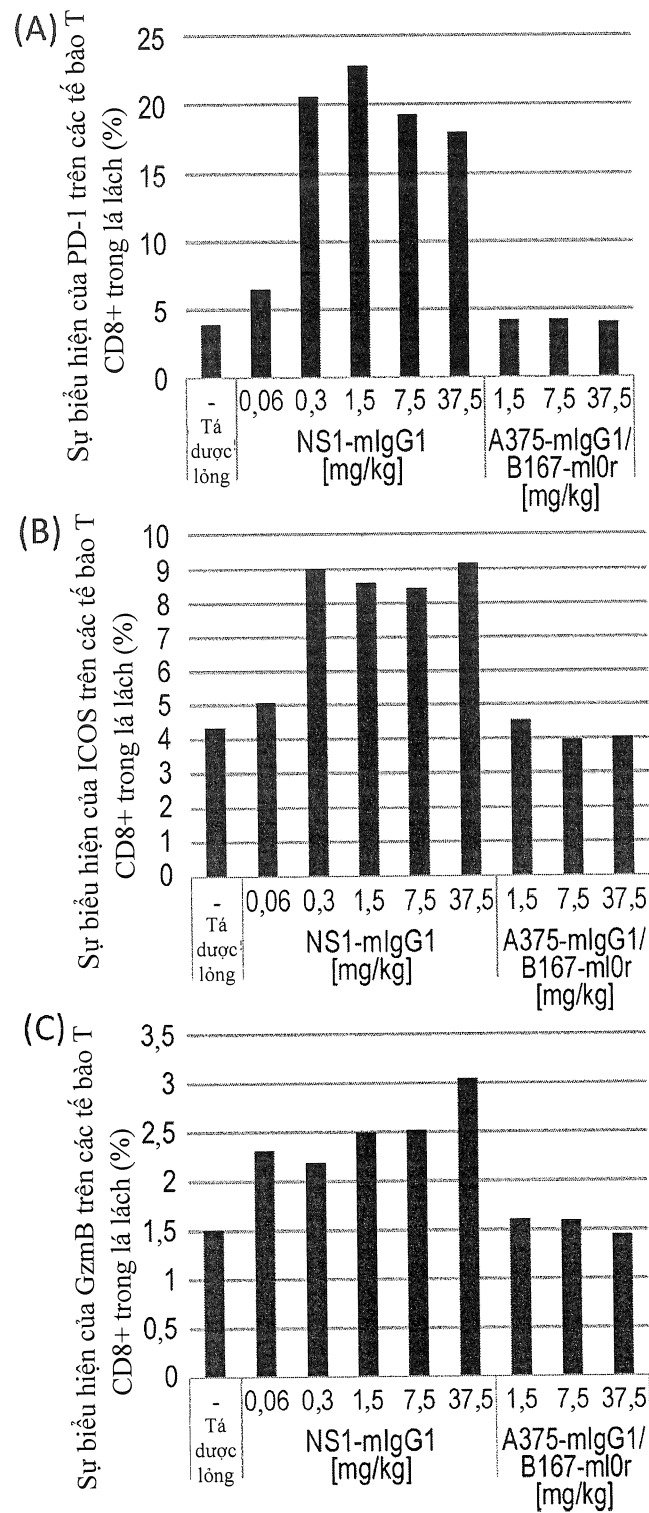


FIG. 30

31/91

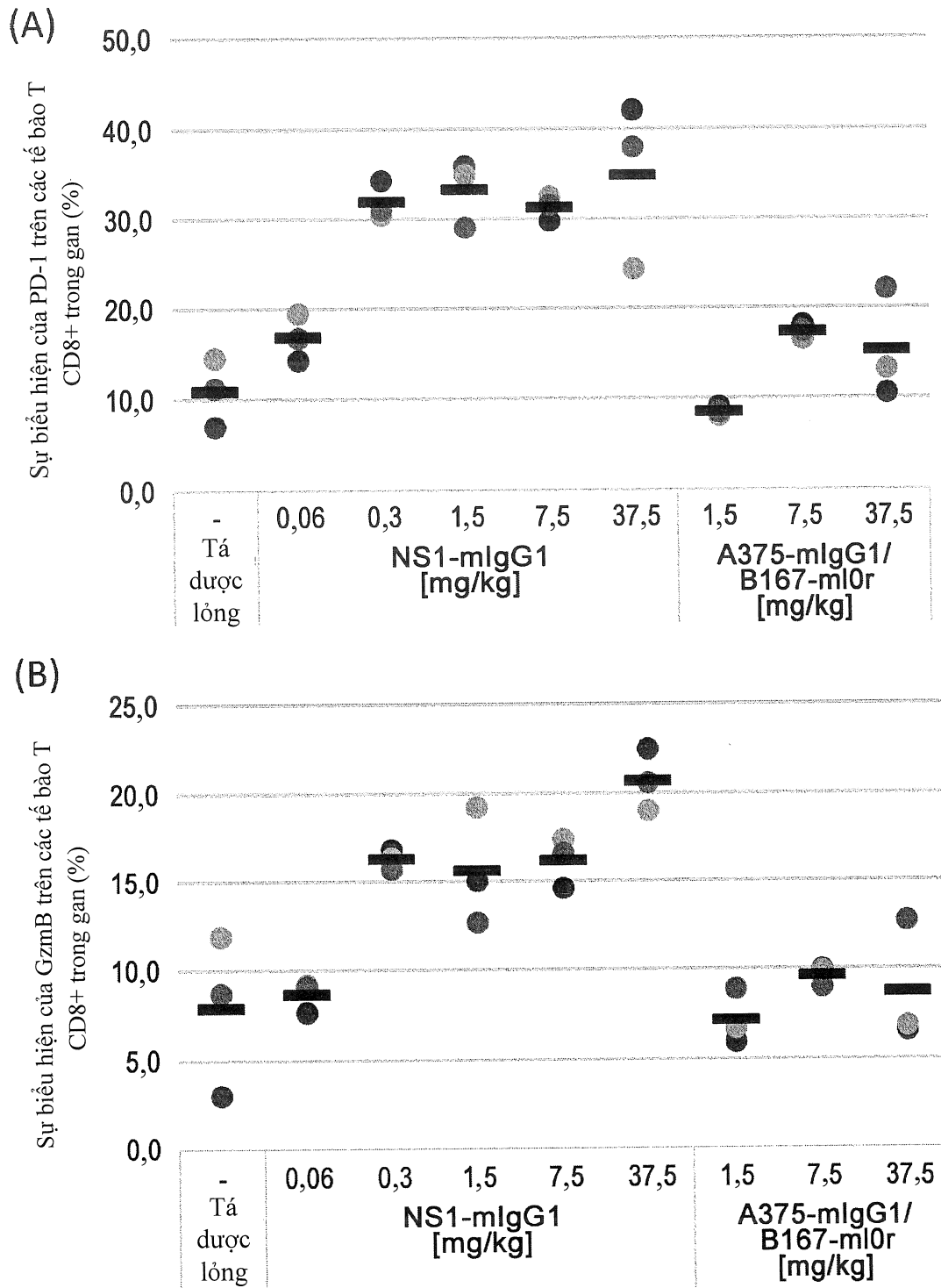


FIG. 31

32/91

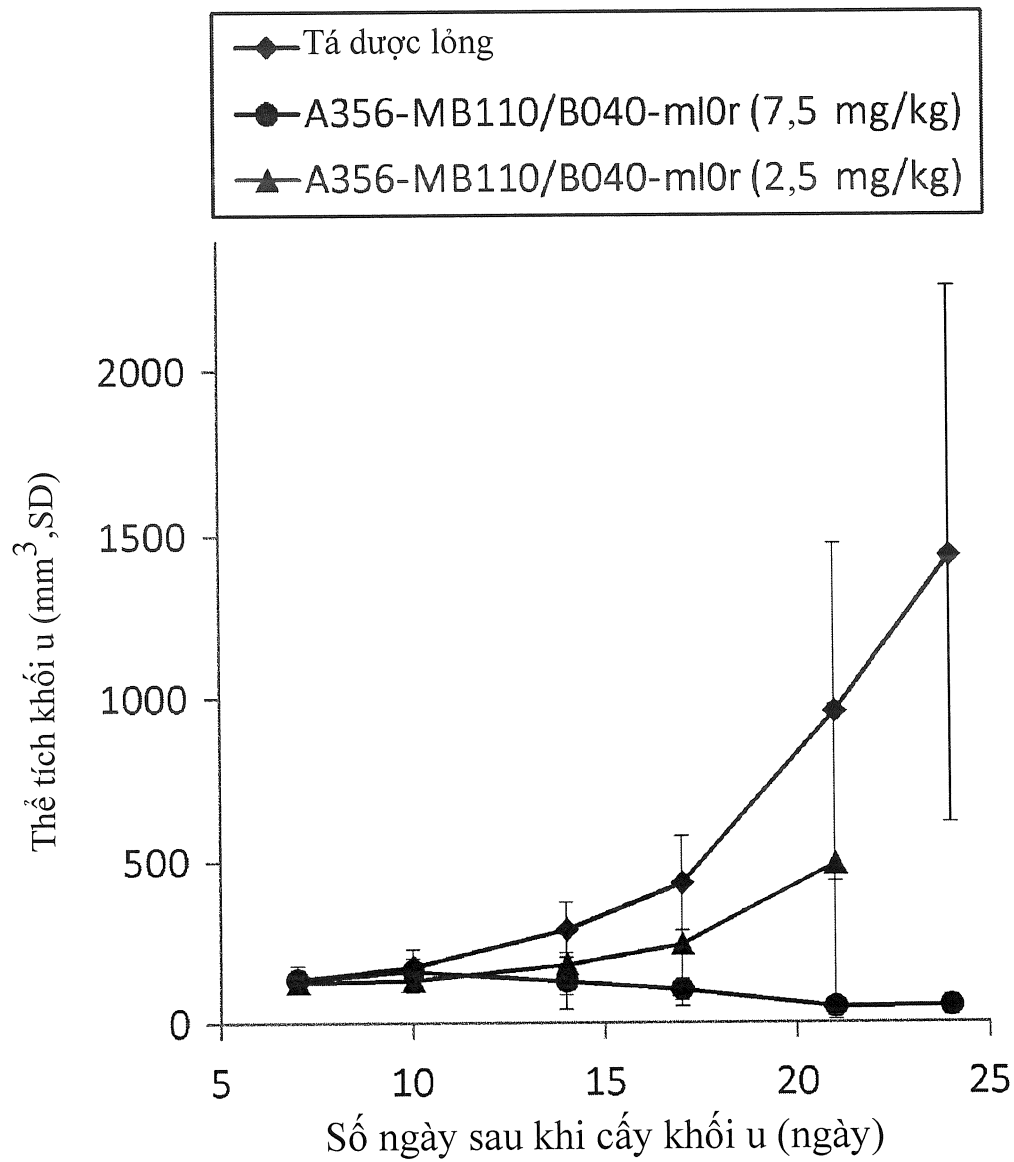


FIG. 32

33/91

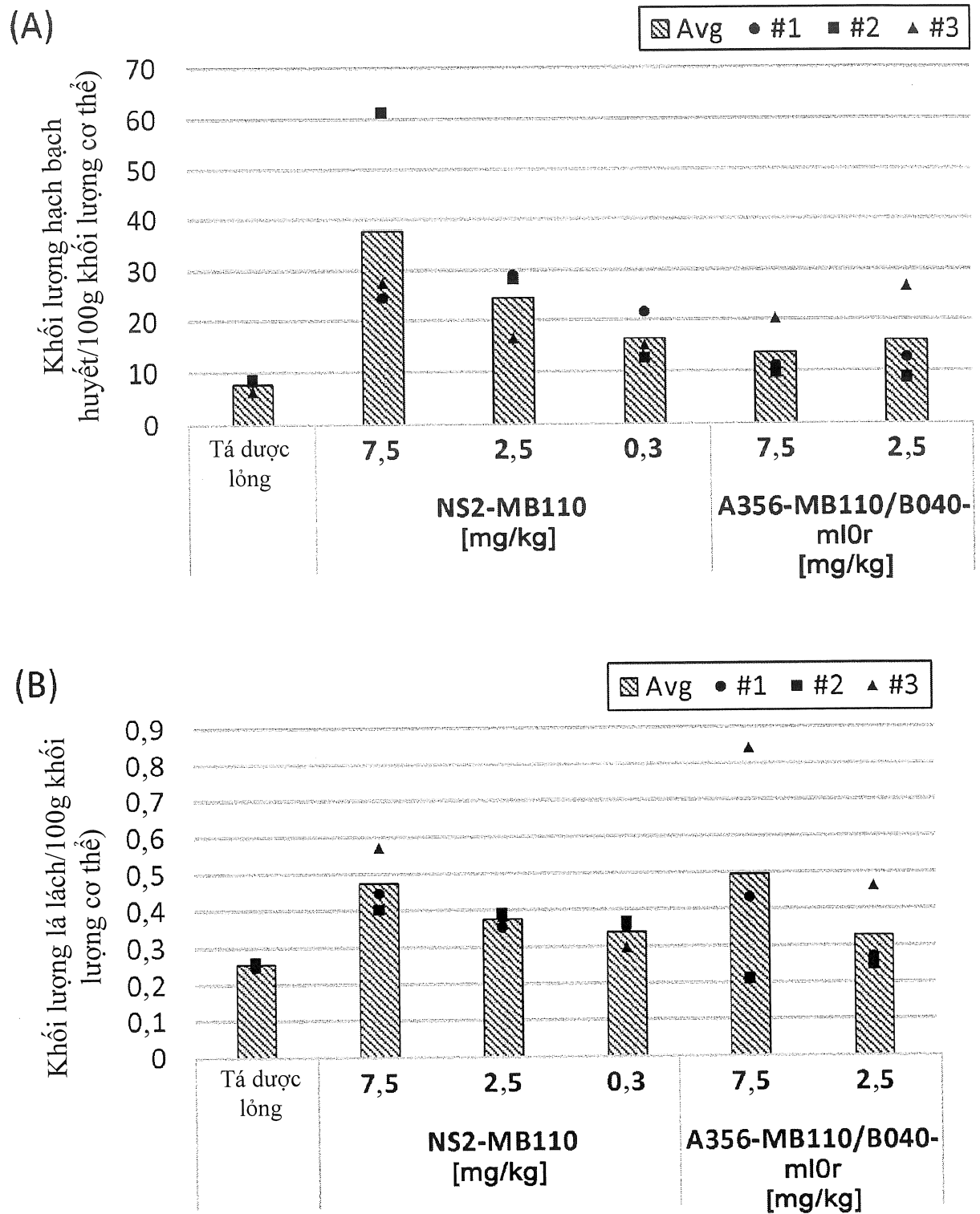


FIG. 33

34/91

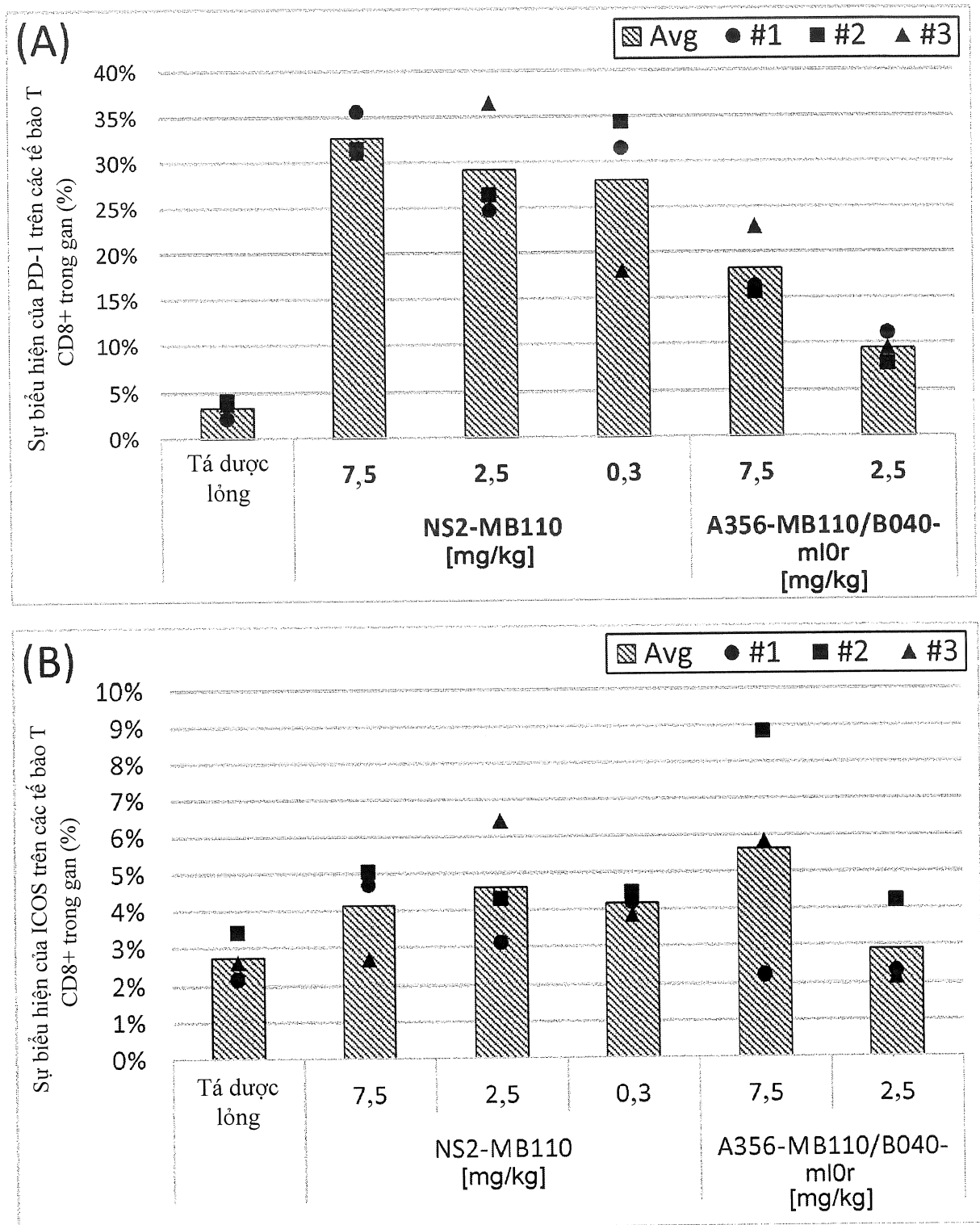


FIG. 34

35/91

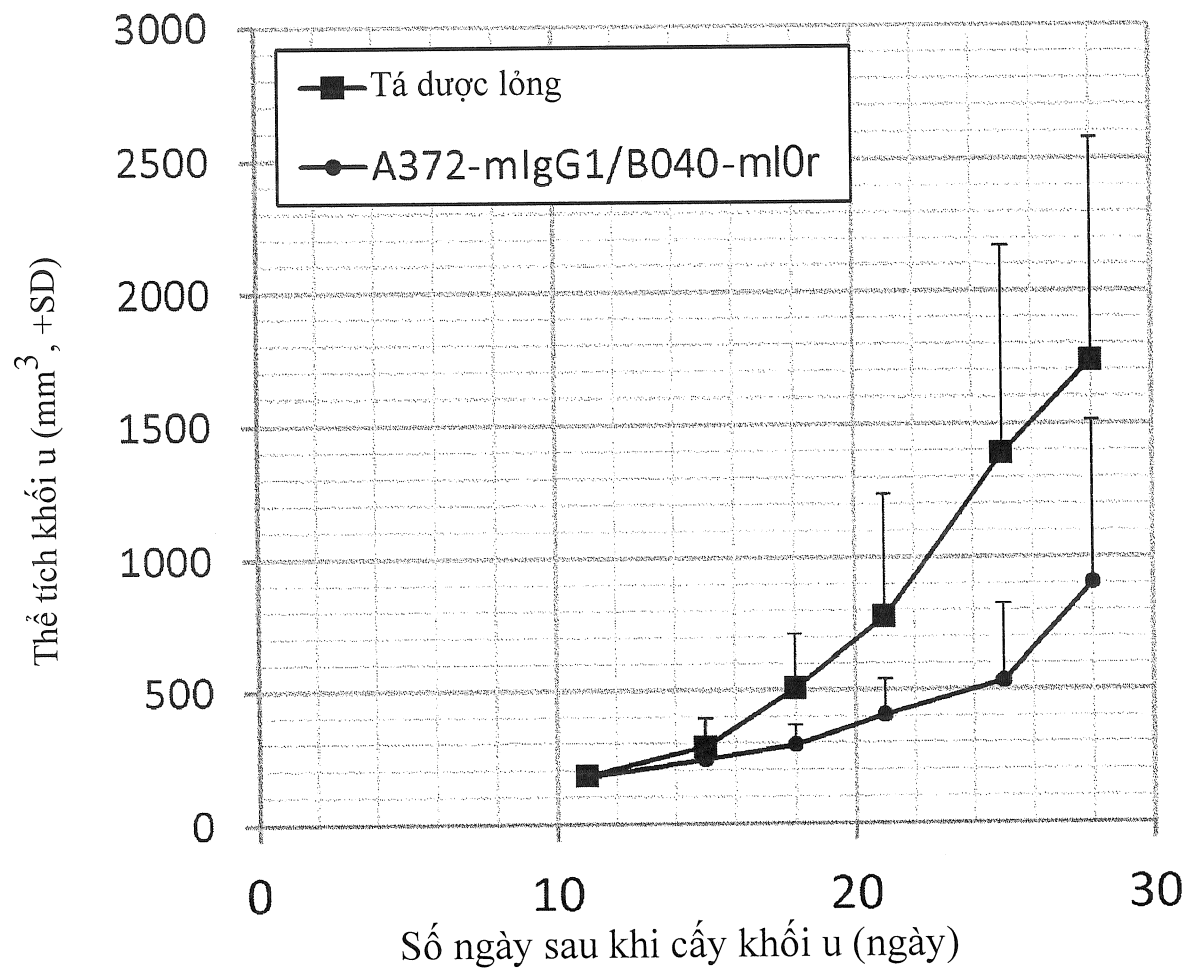


FIG. 35

36/91

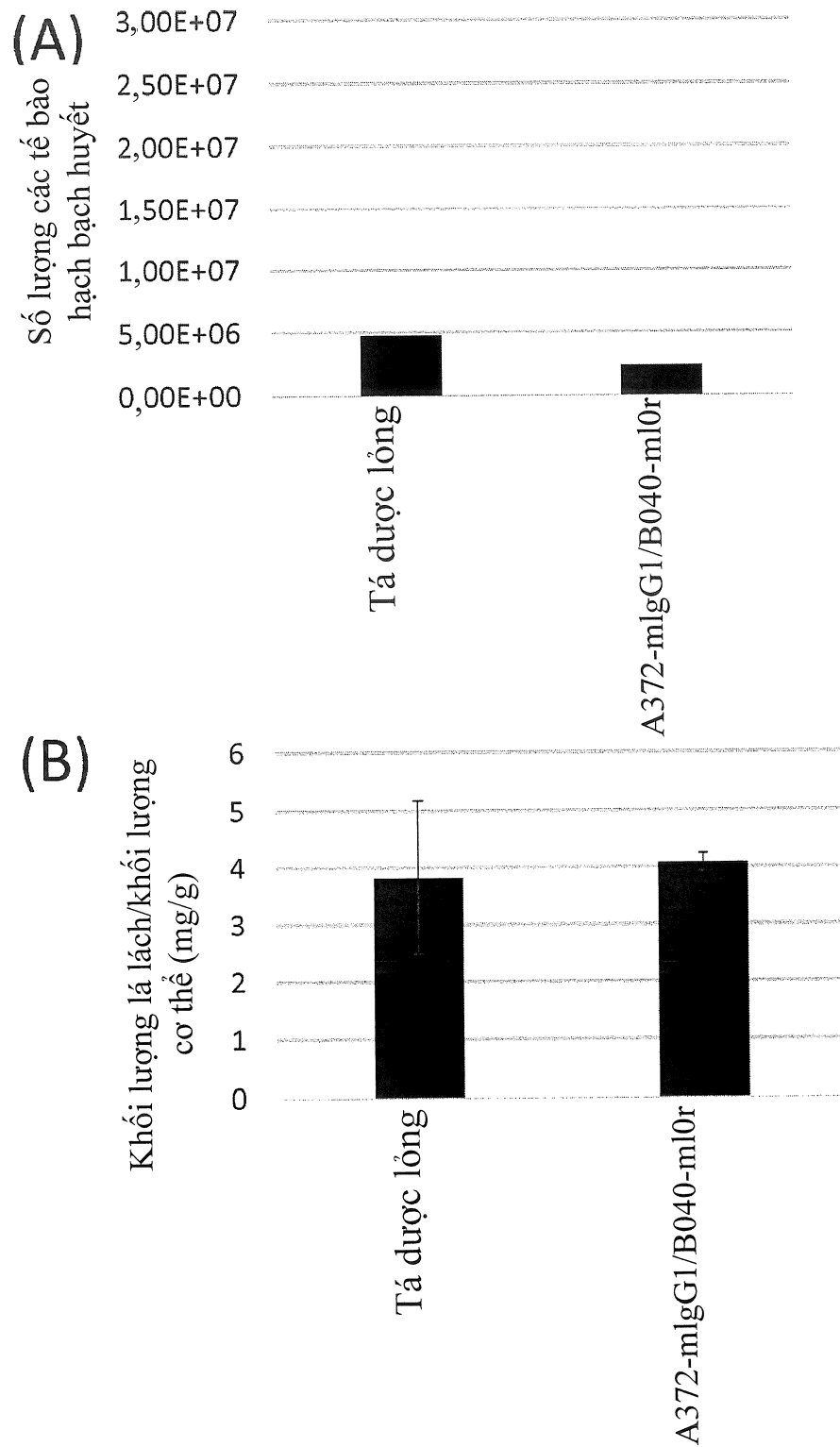


FIG. 36

37/91

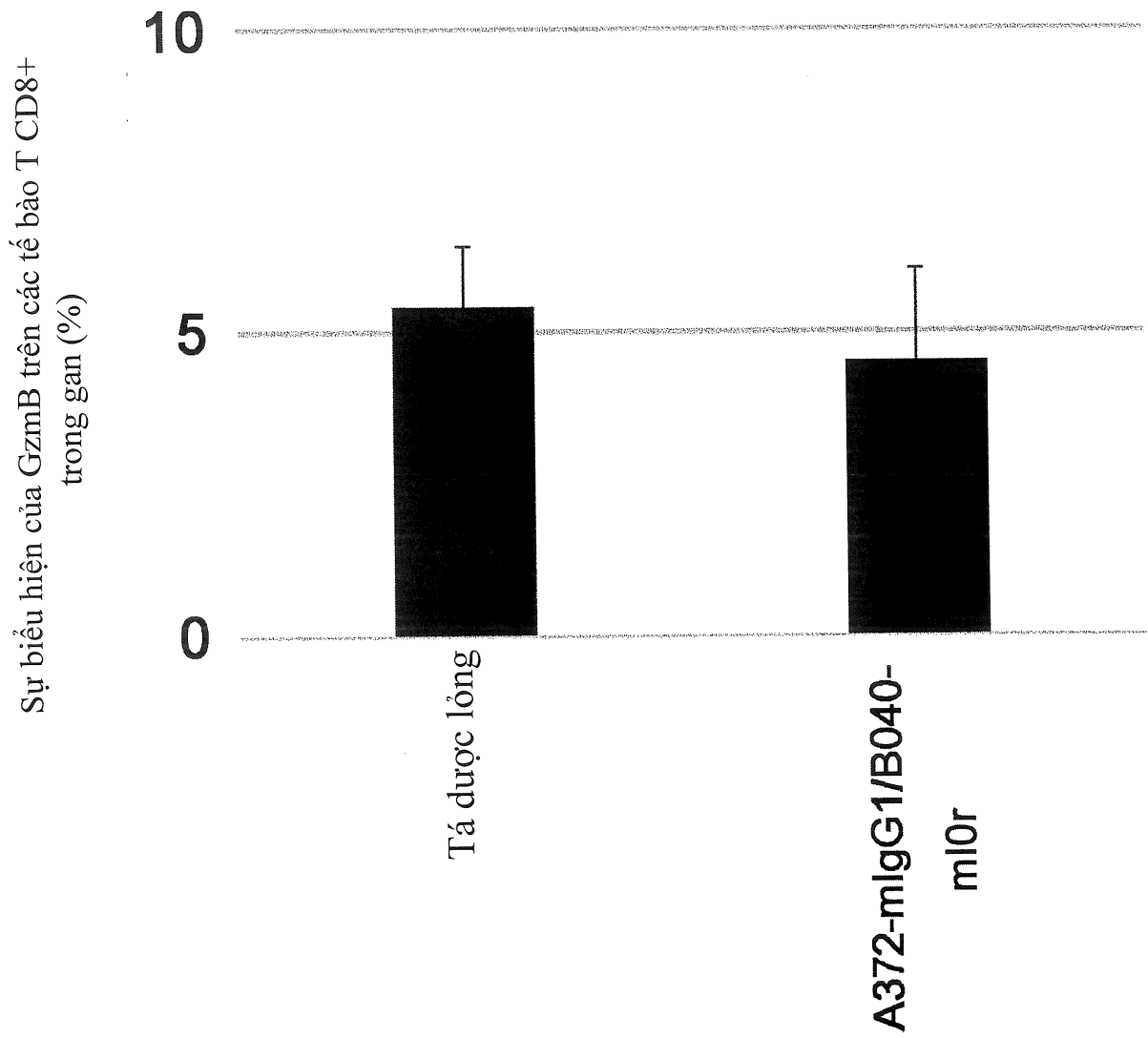


FIG. 37

38/91

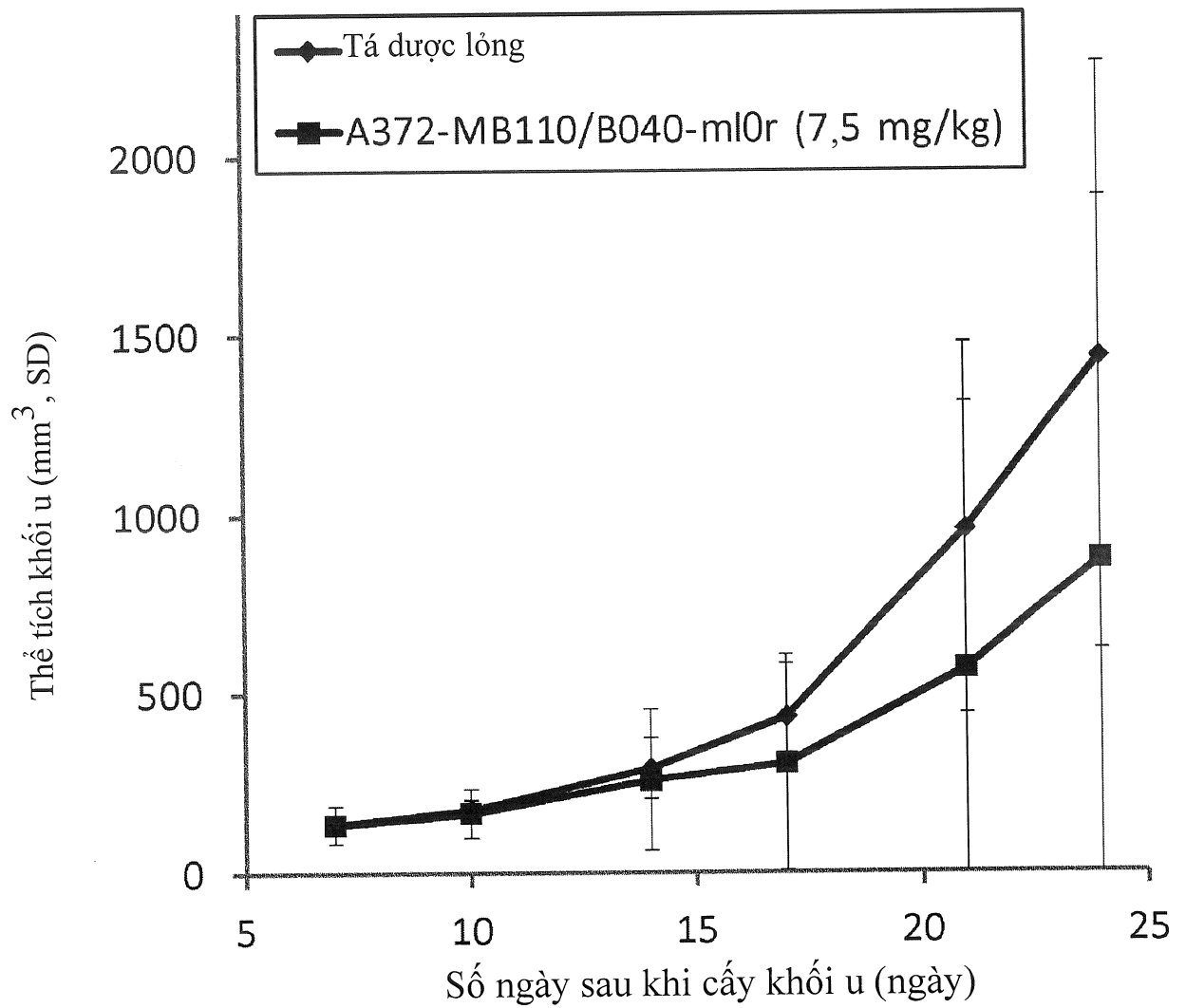


FIG. 38

39/91

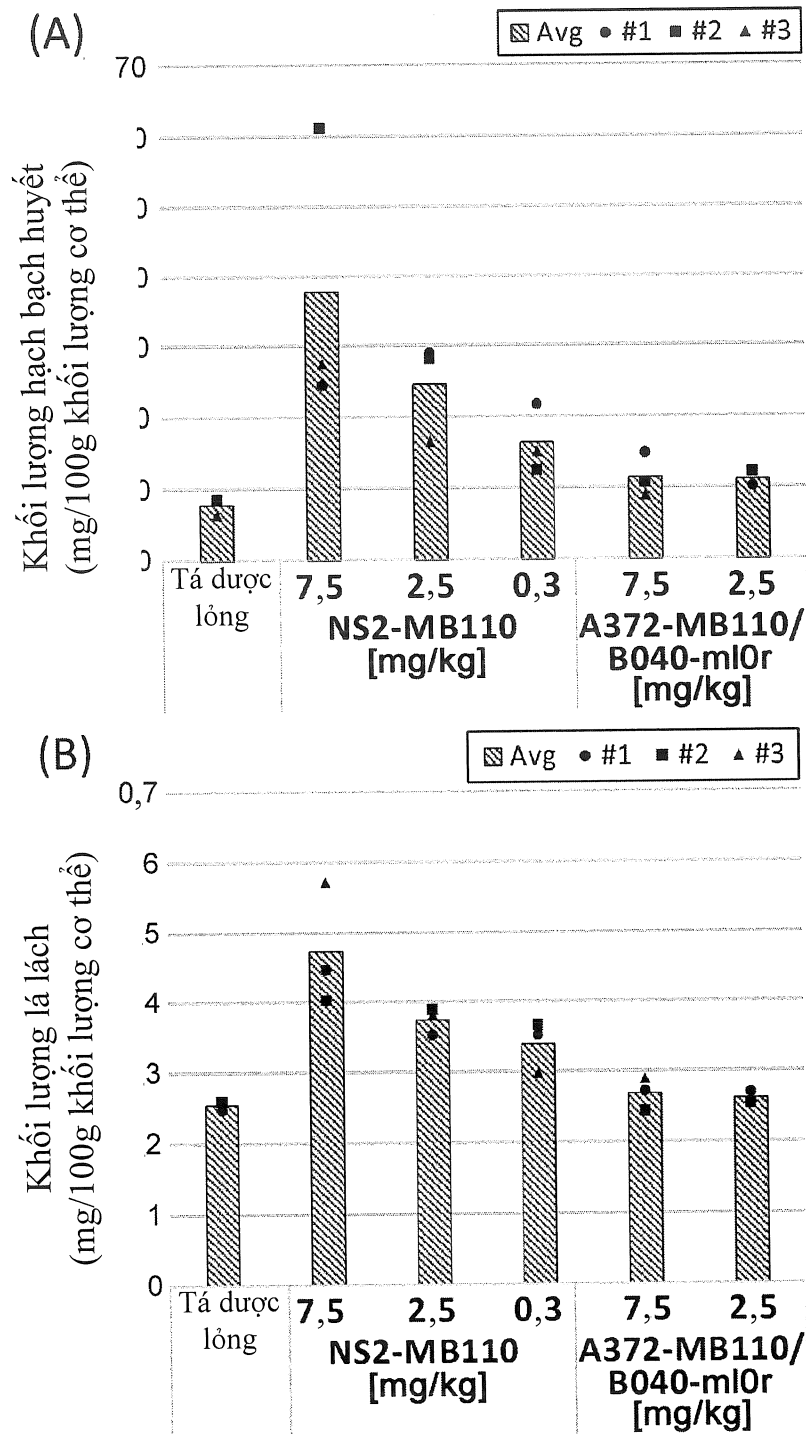


FIG. 39

40/91

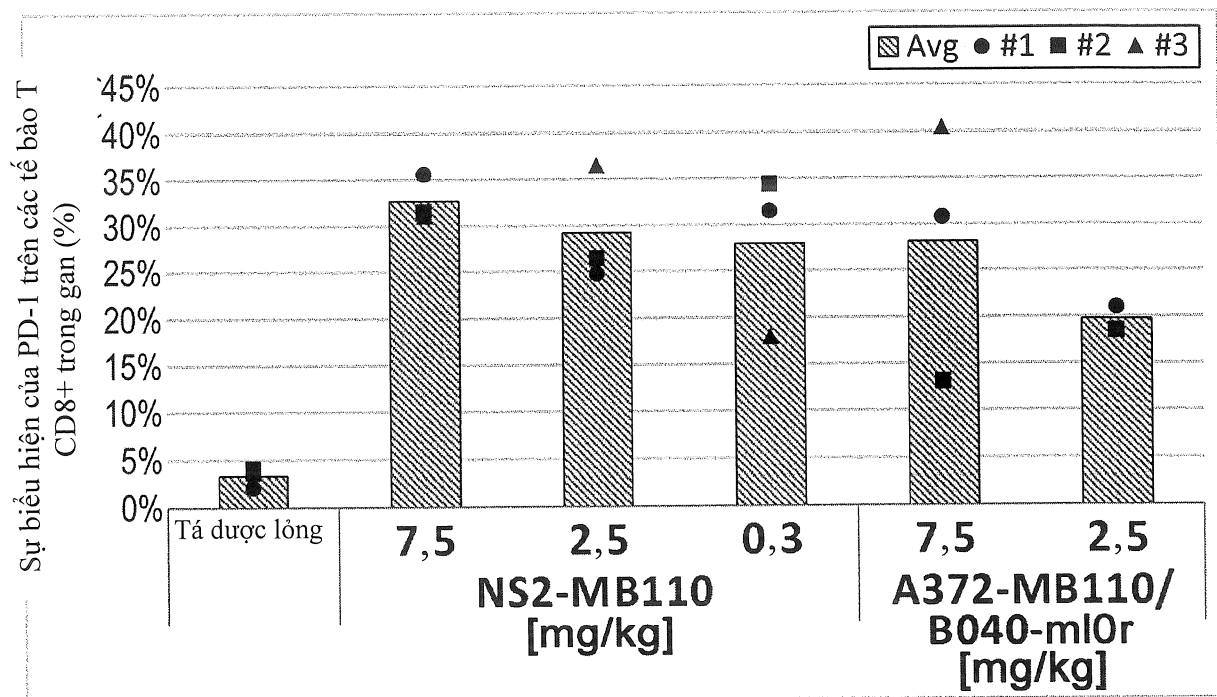


FIG. 40

41/91

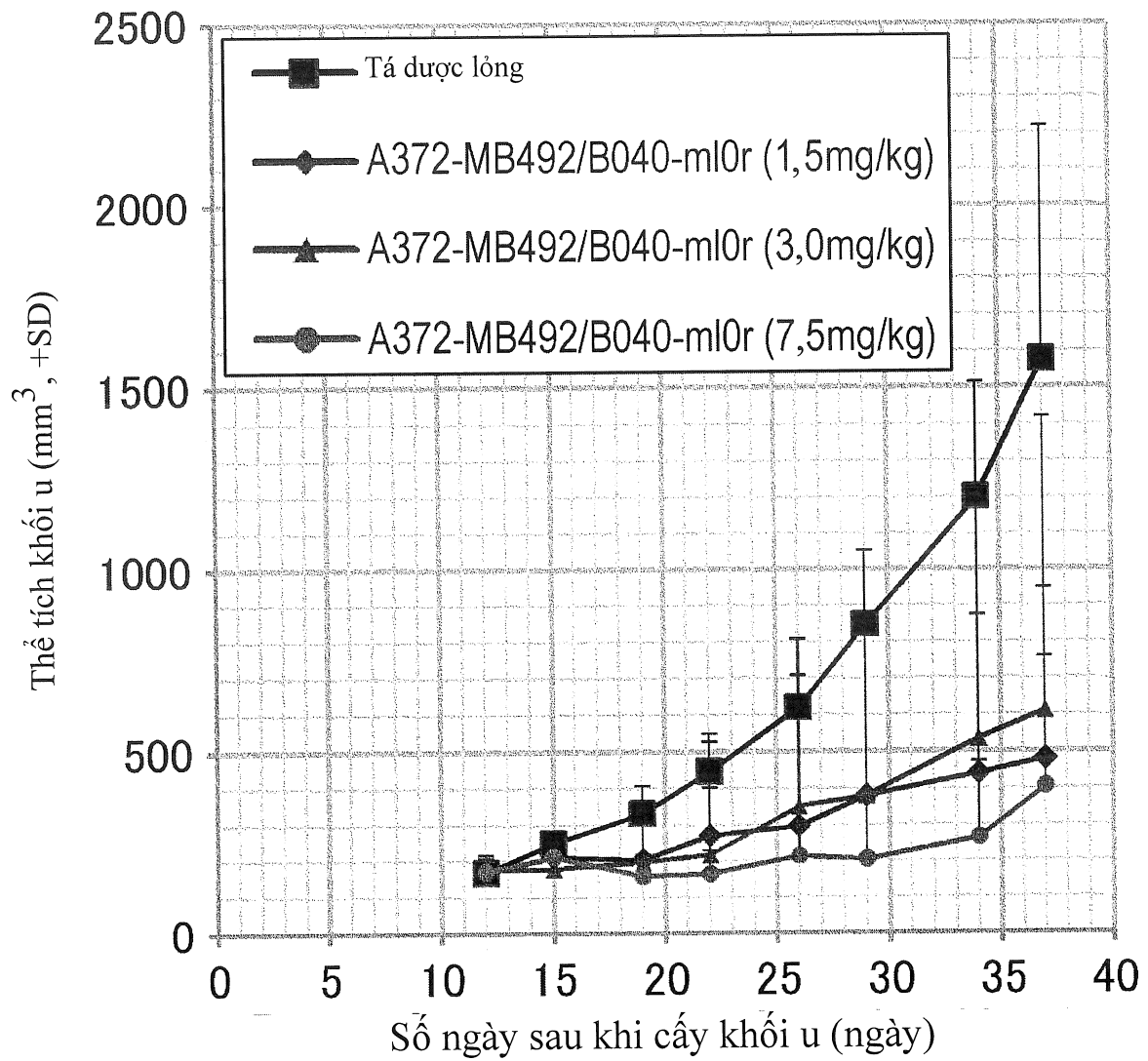


FIG. 41

42/91

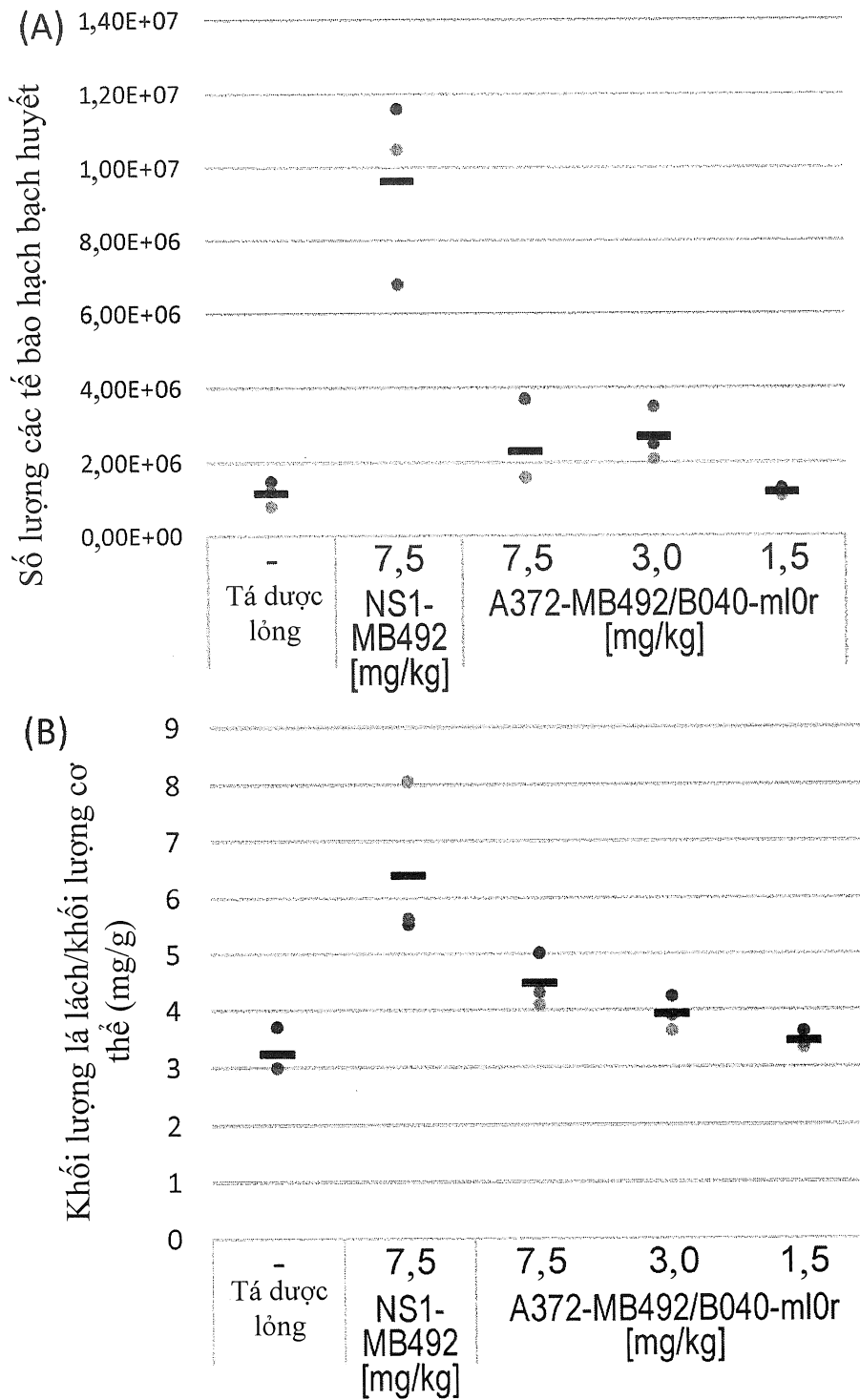


FIG. 42

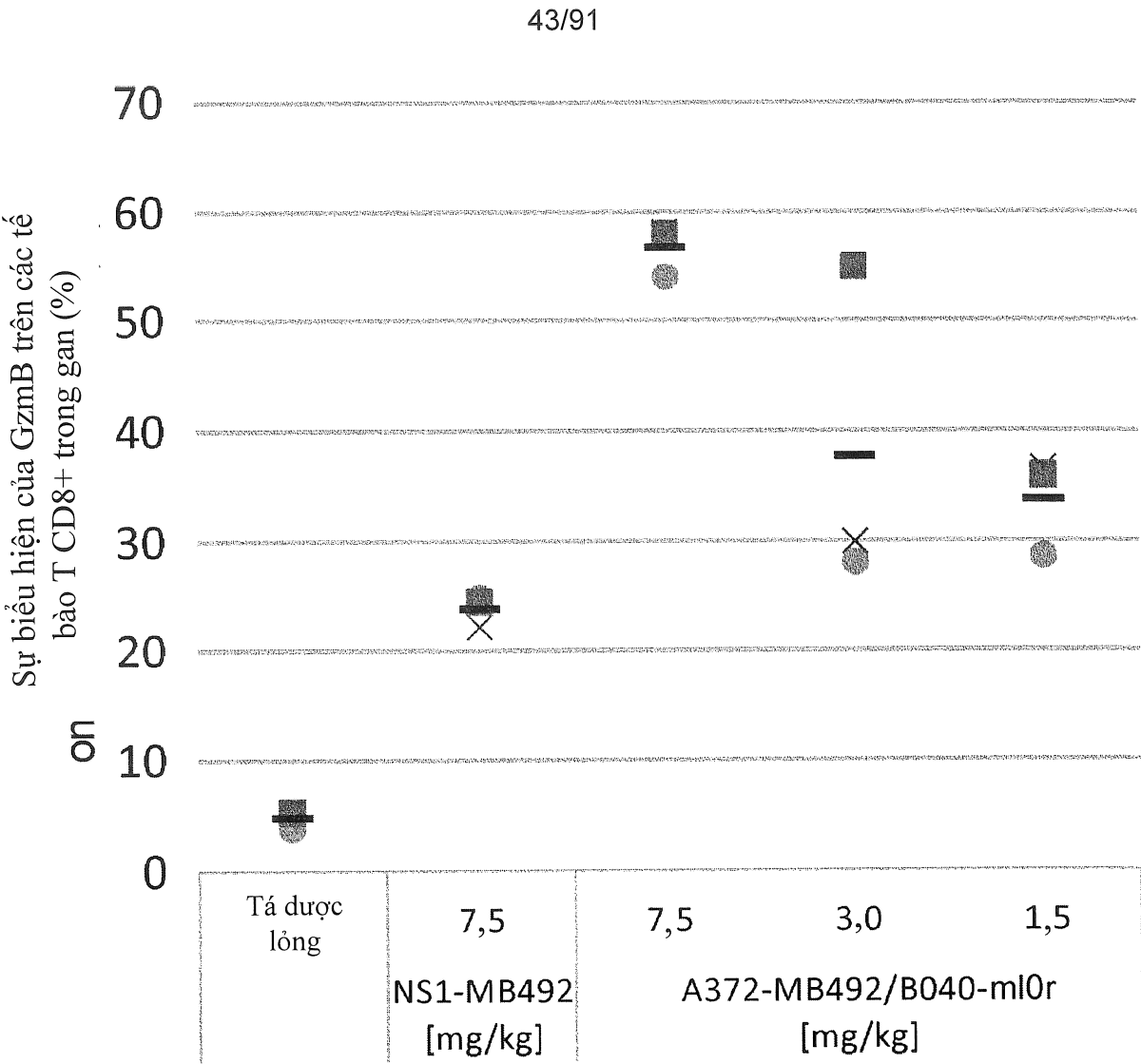


FIG. 43

44/91

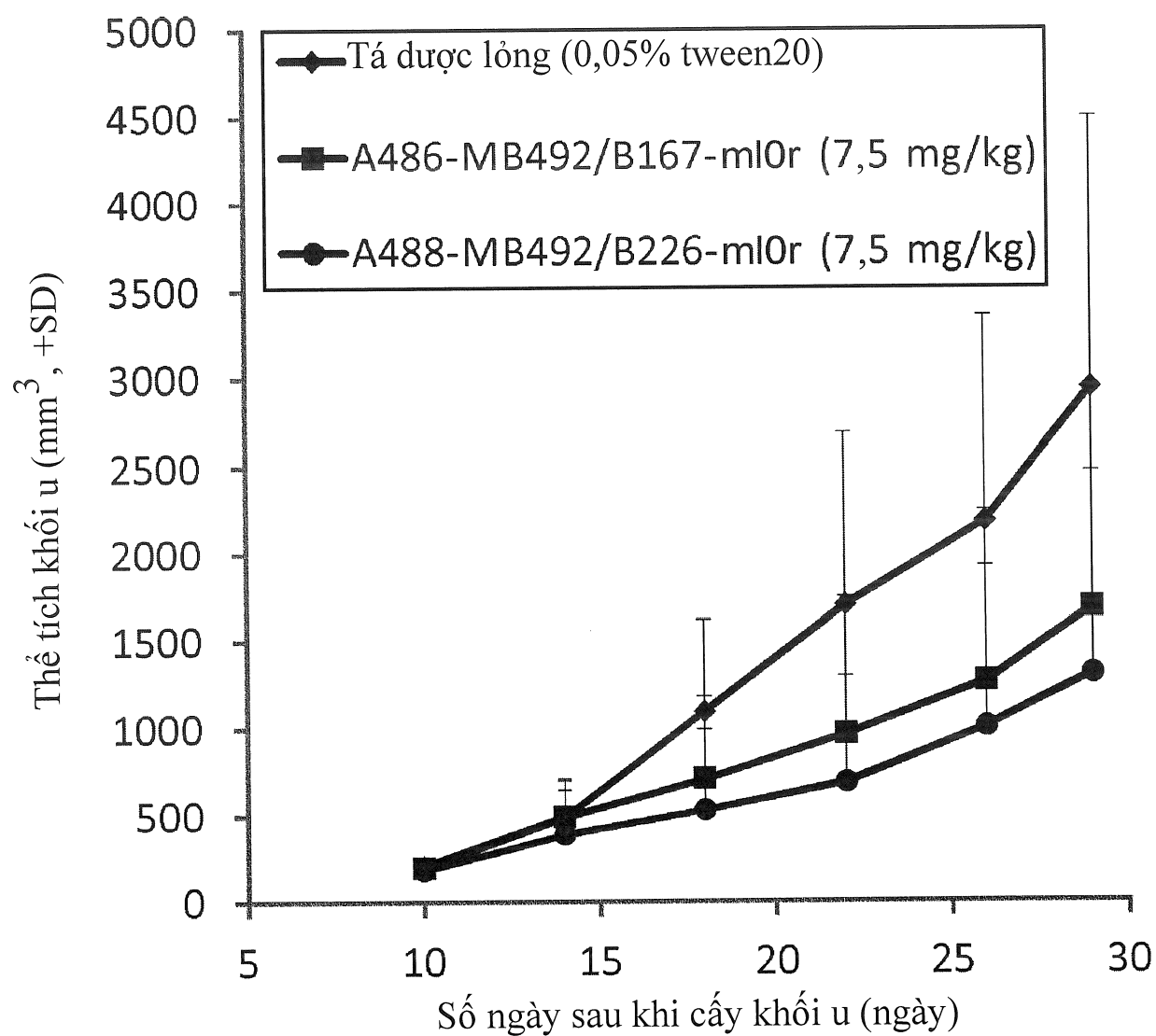


FIG. 44

45/91

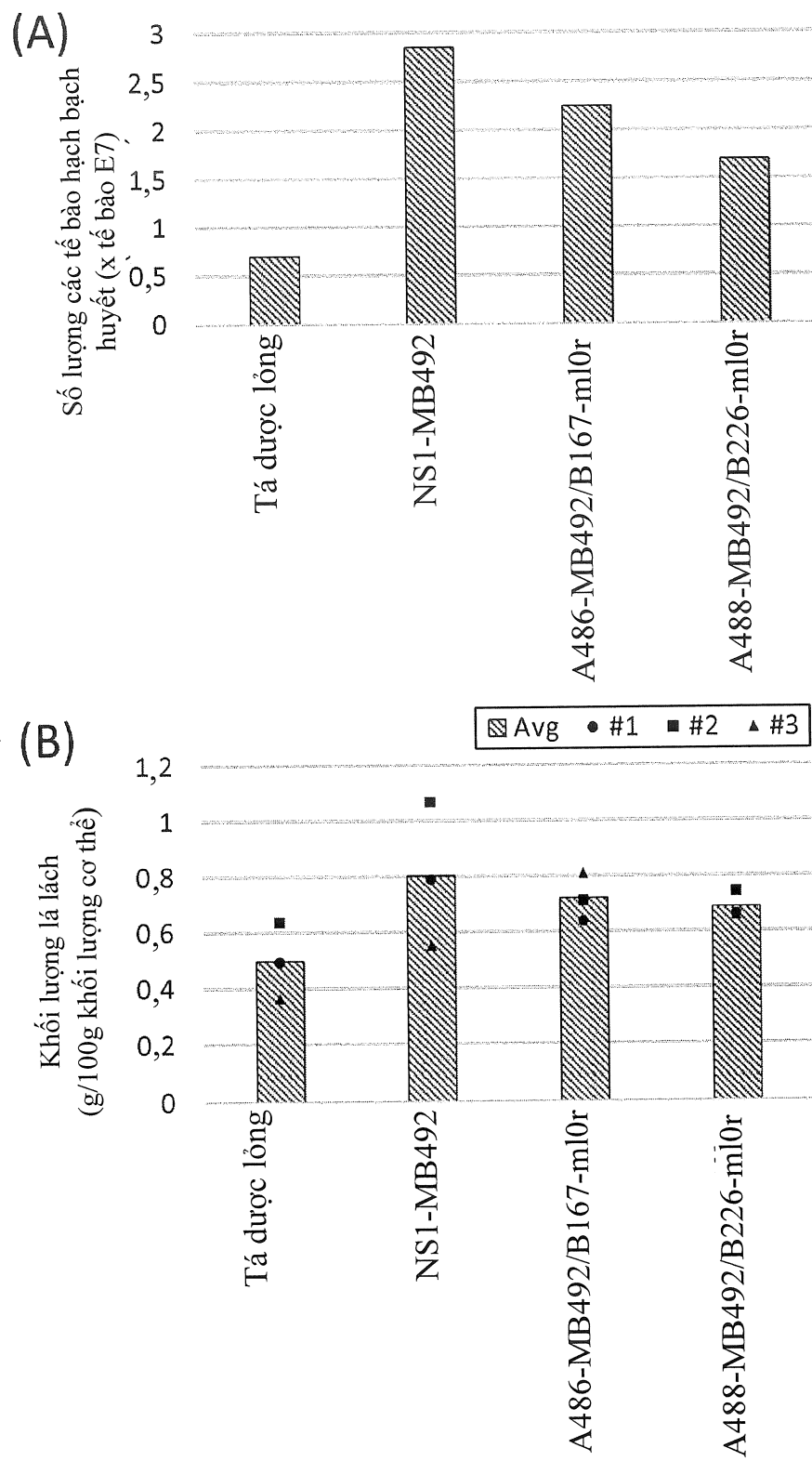


FIG. 45

46/91

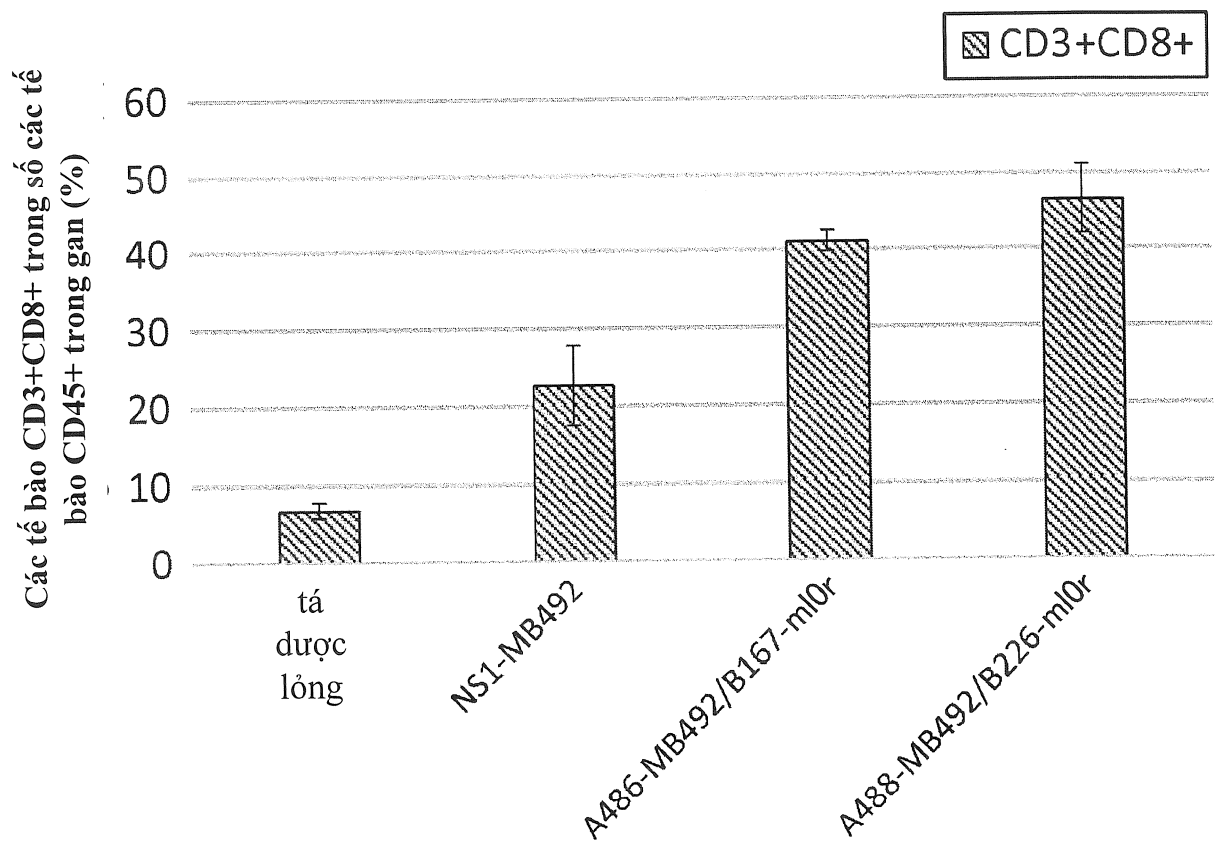


FIG. 46

47/91

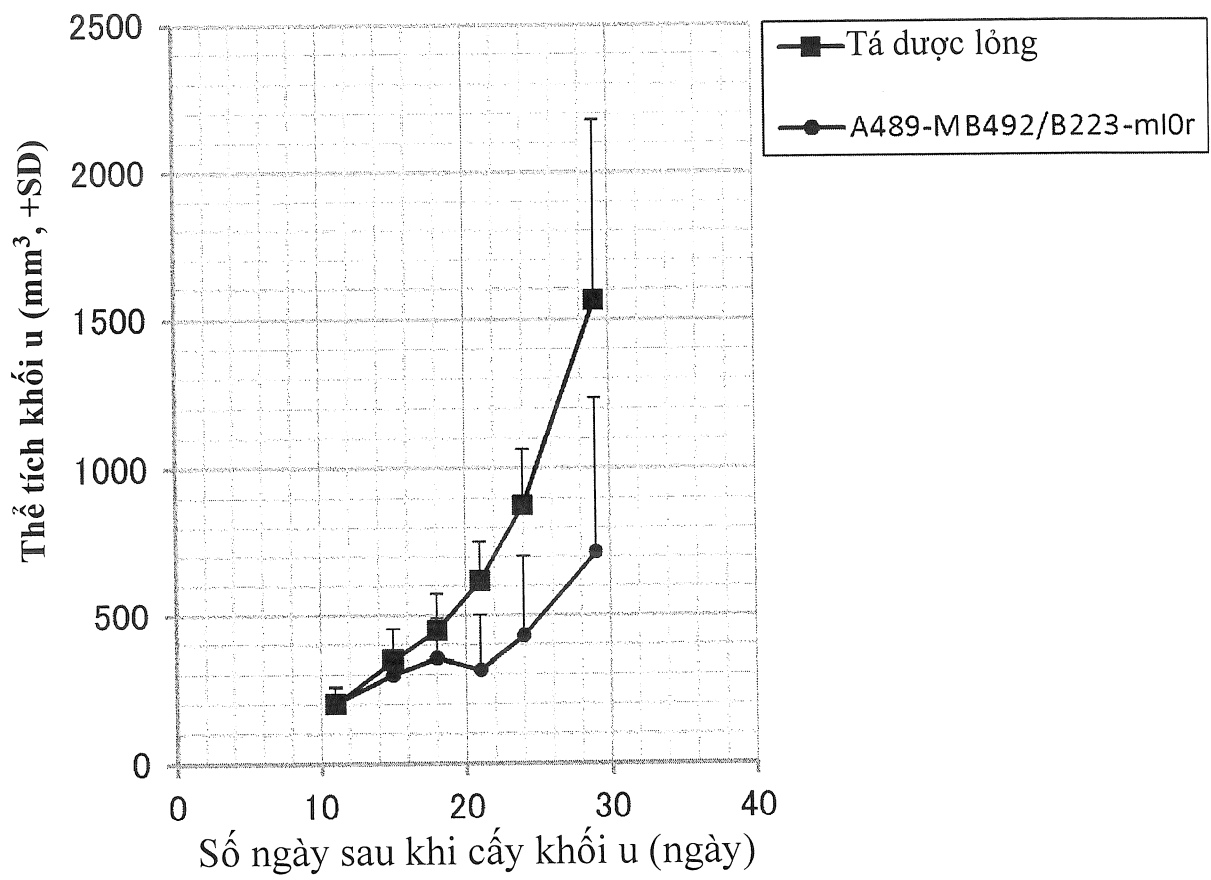


FIG. 47

48/91

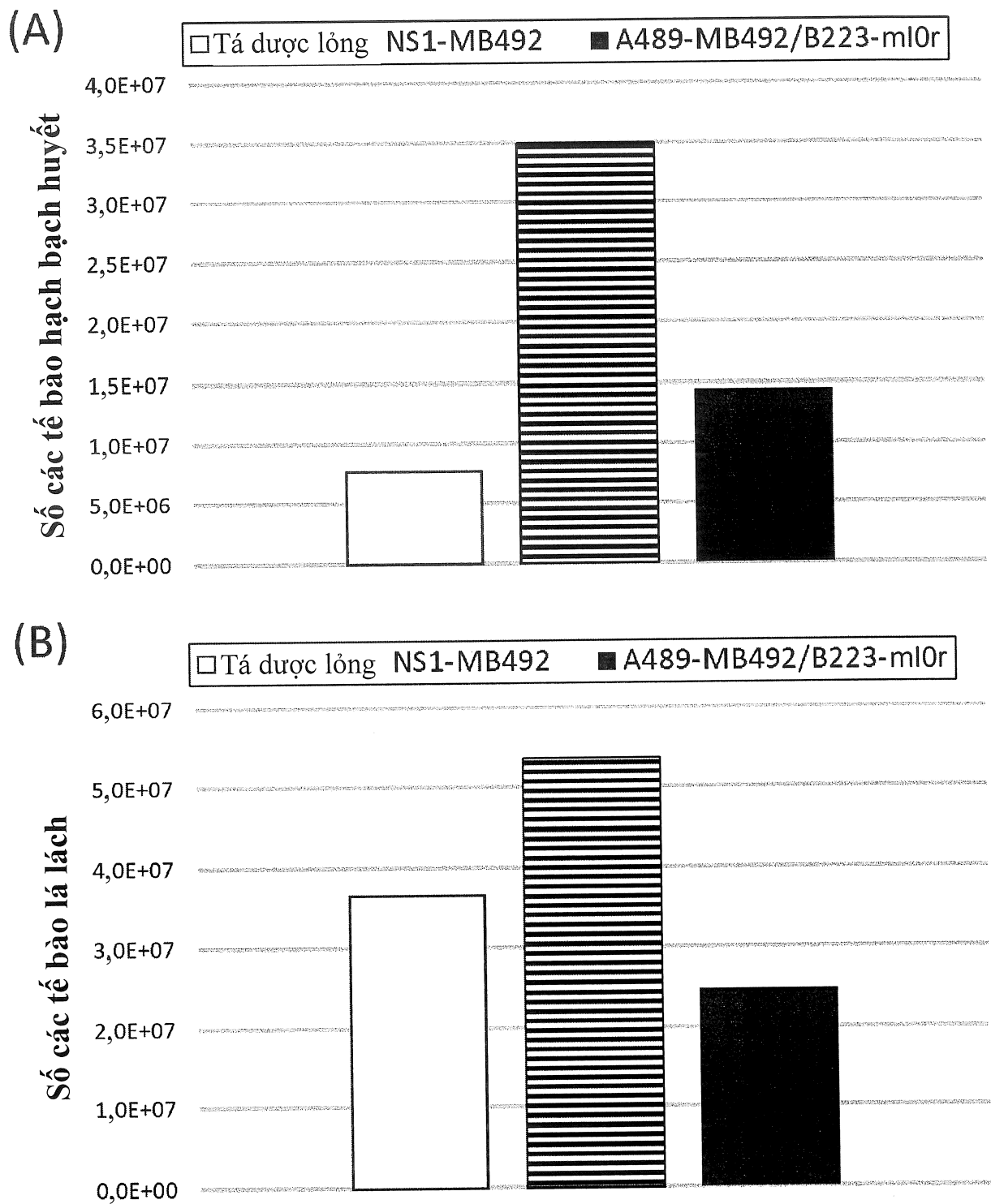


FIG. 48

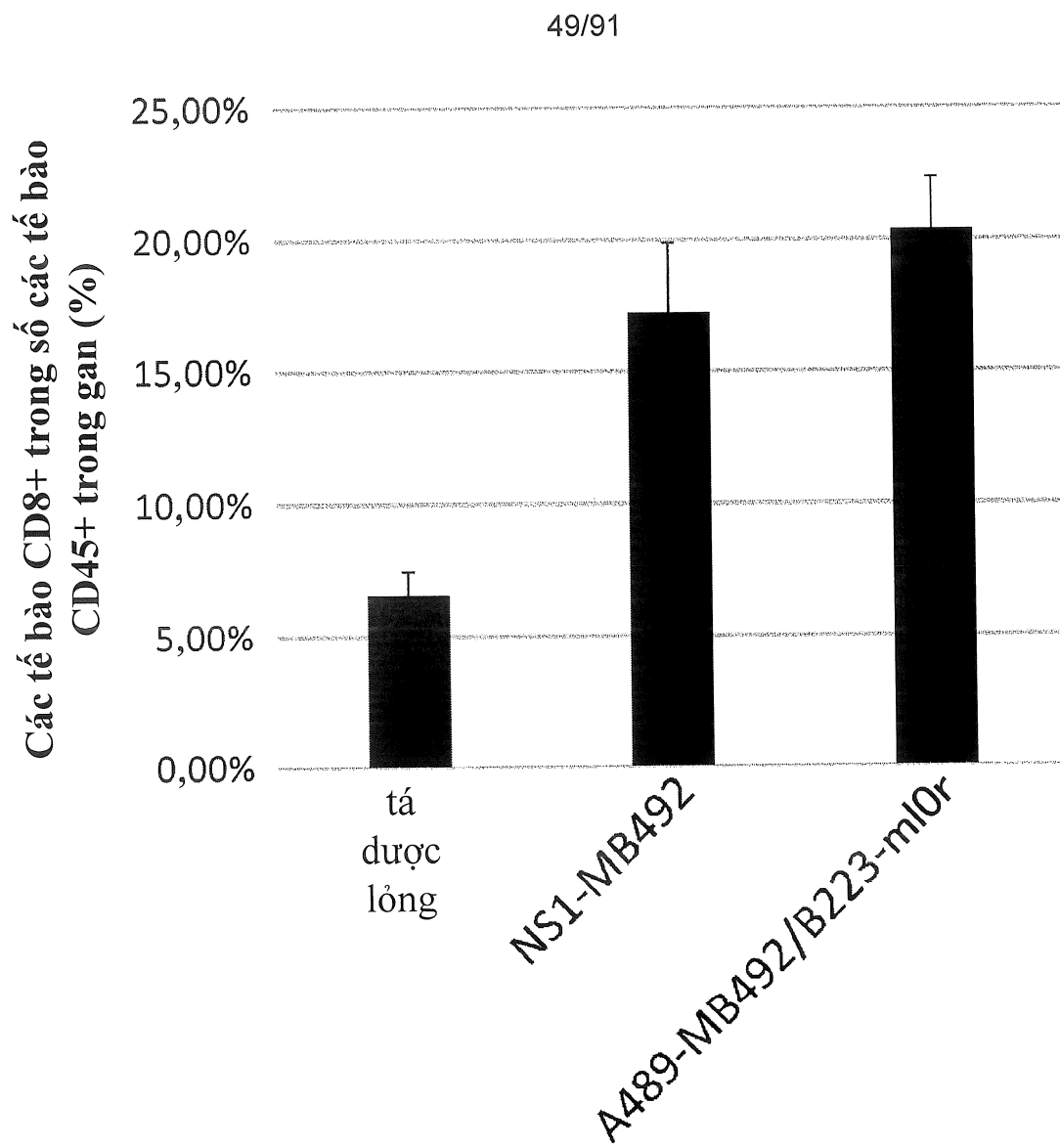


FIG. 49

50/91

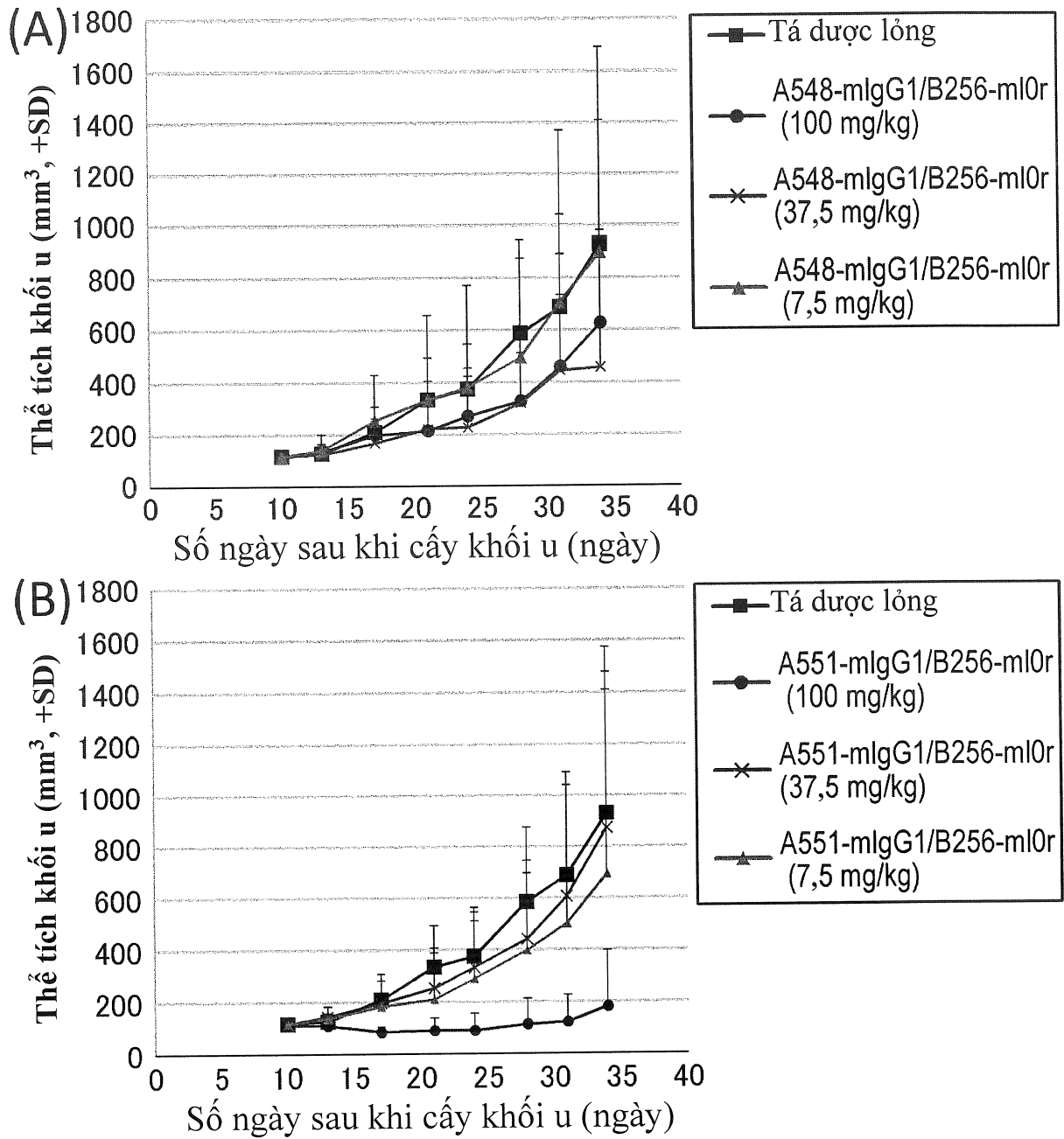


FIG. 50

51/91

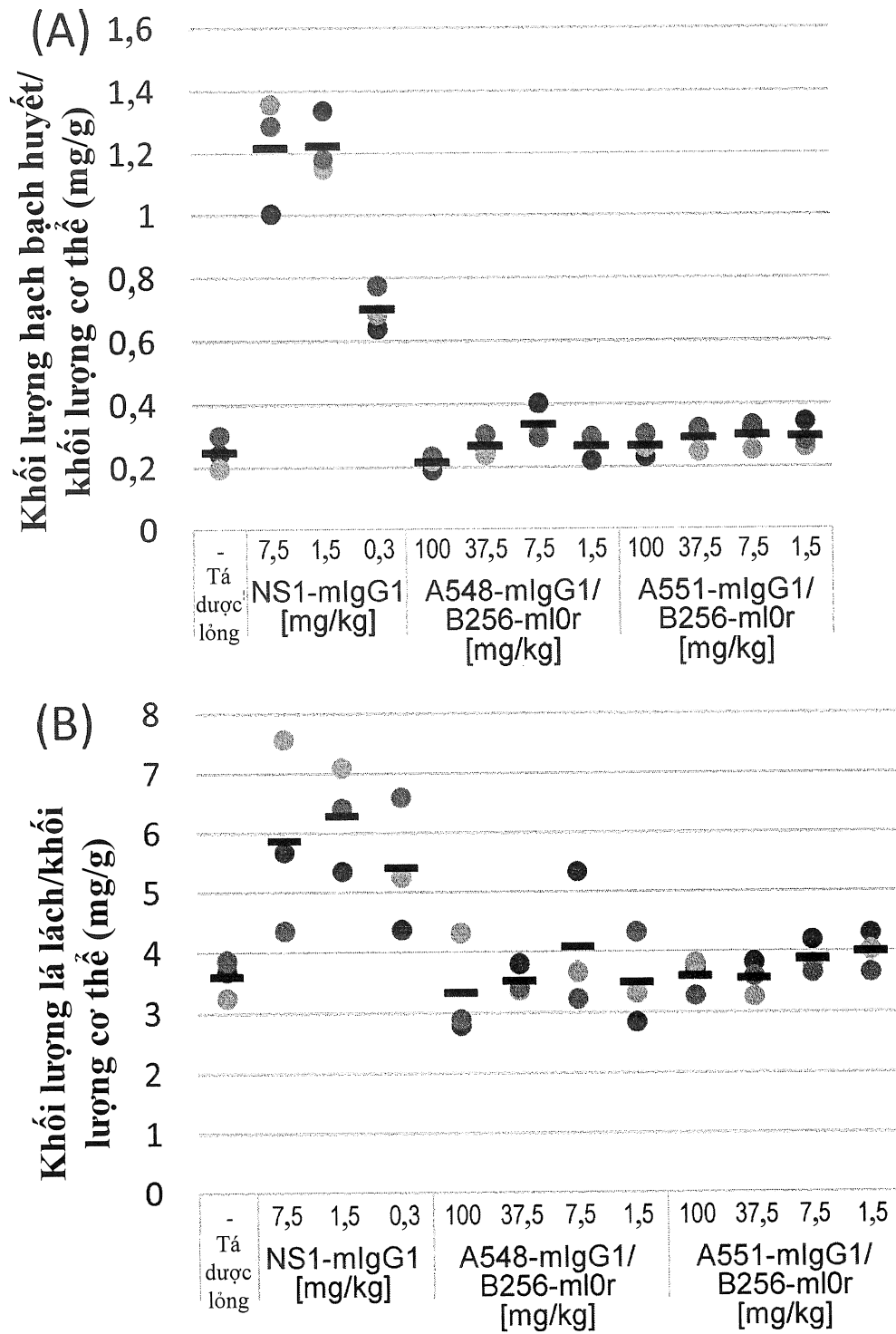


FIG. 51

52/91

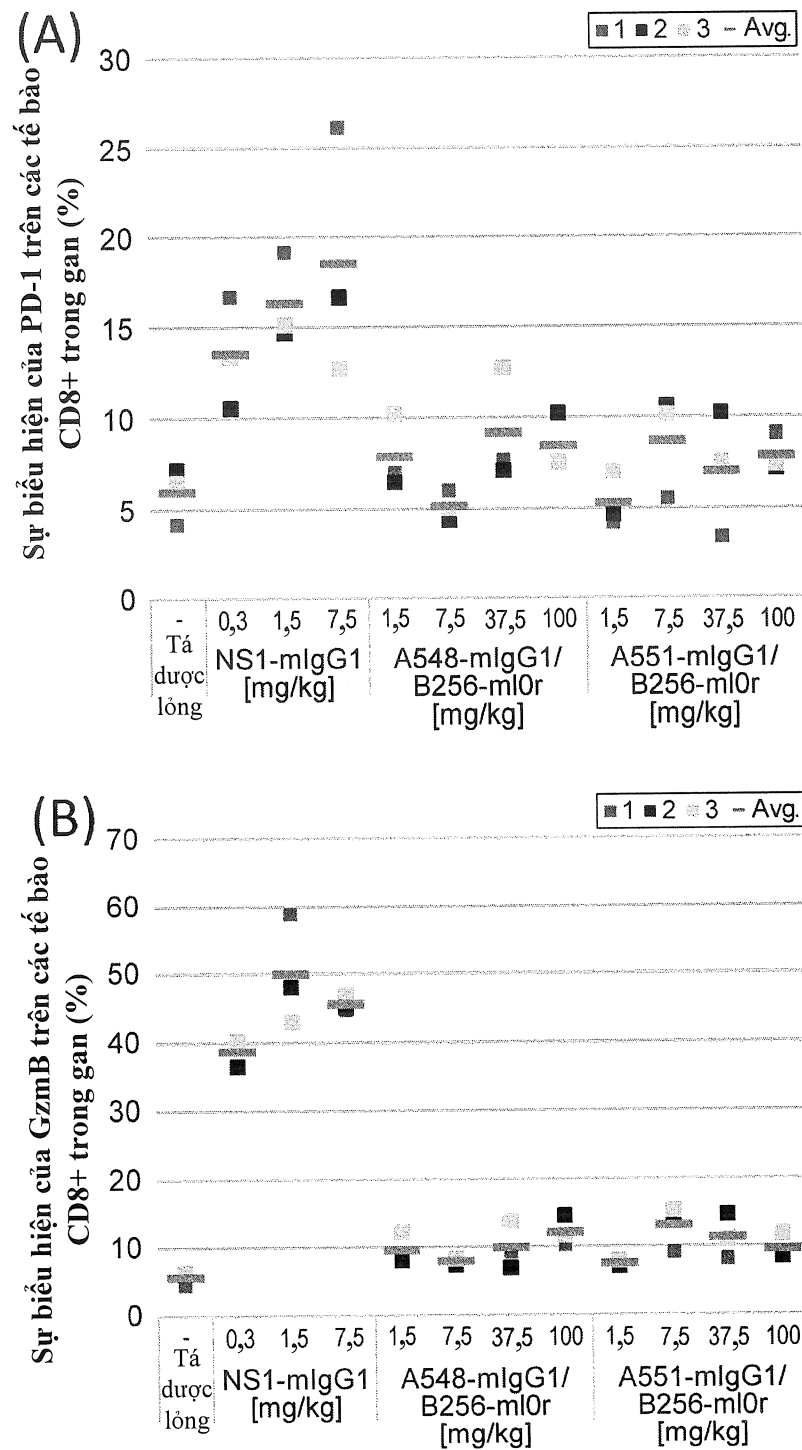


FIG. 52

53/91

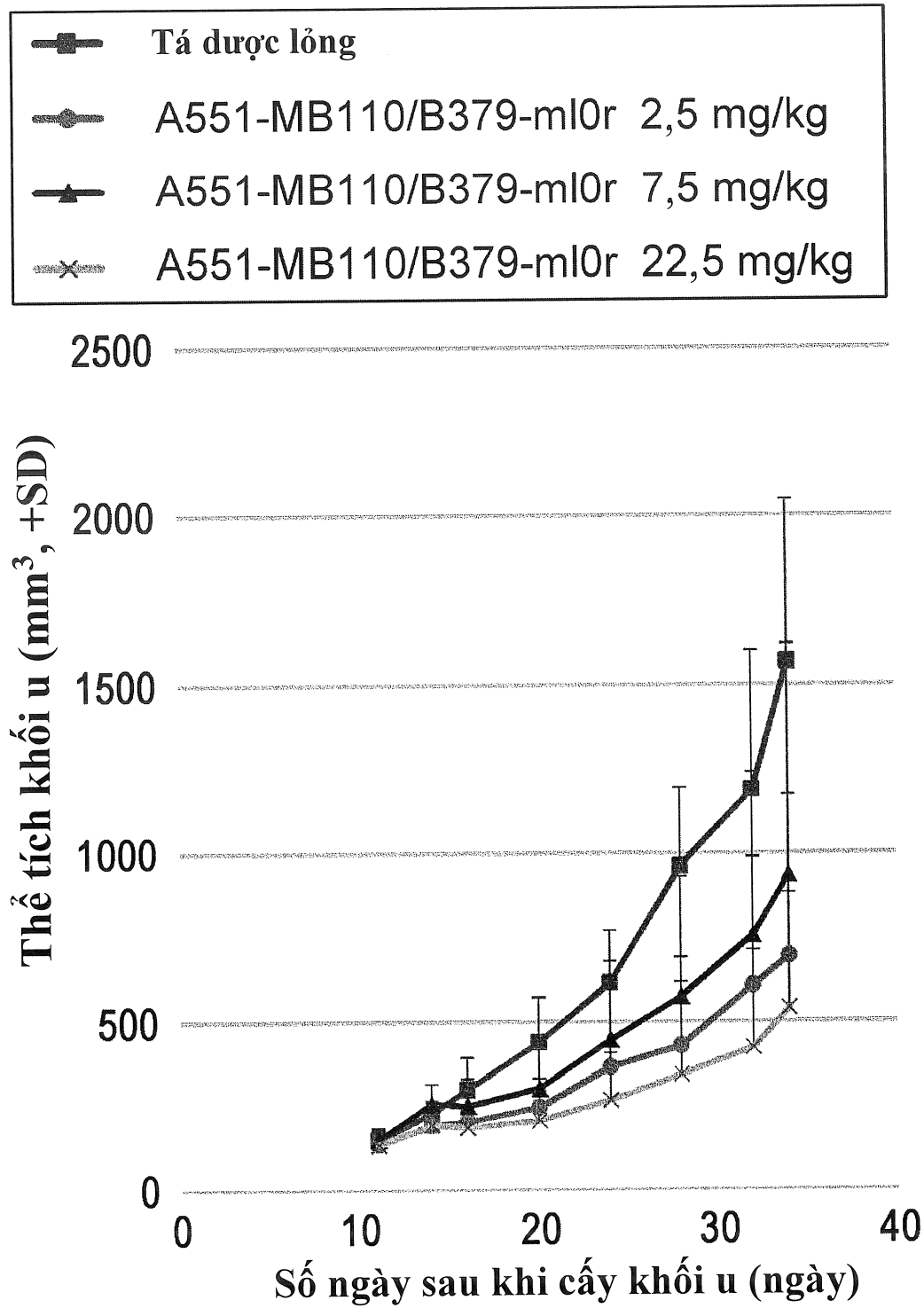


FIG. 53

54/91

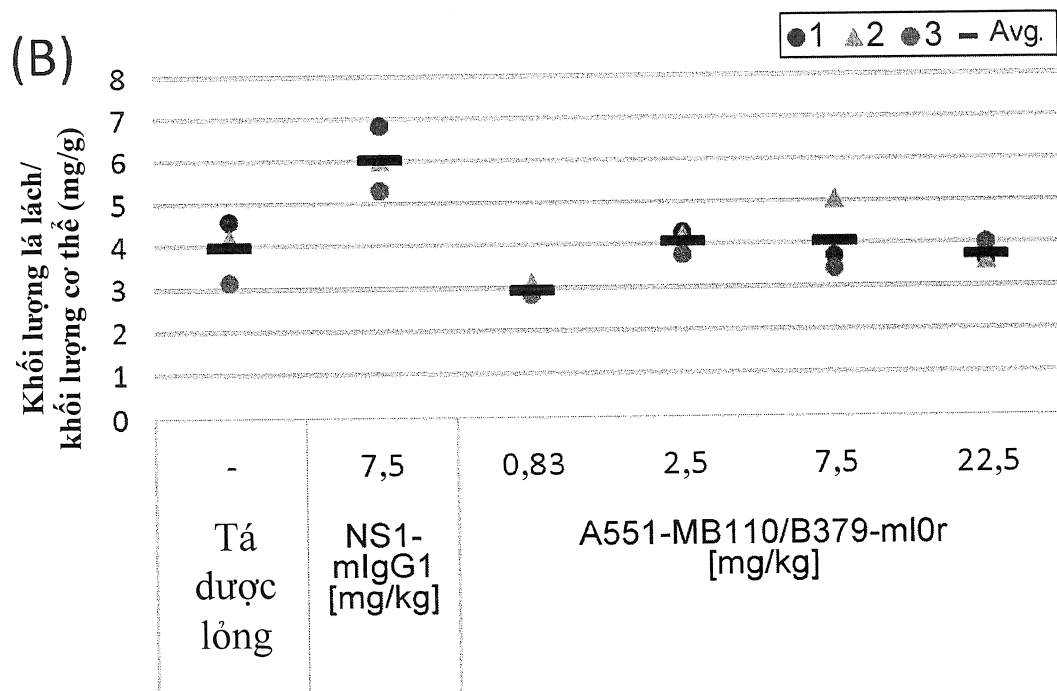
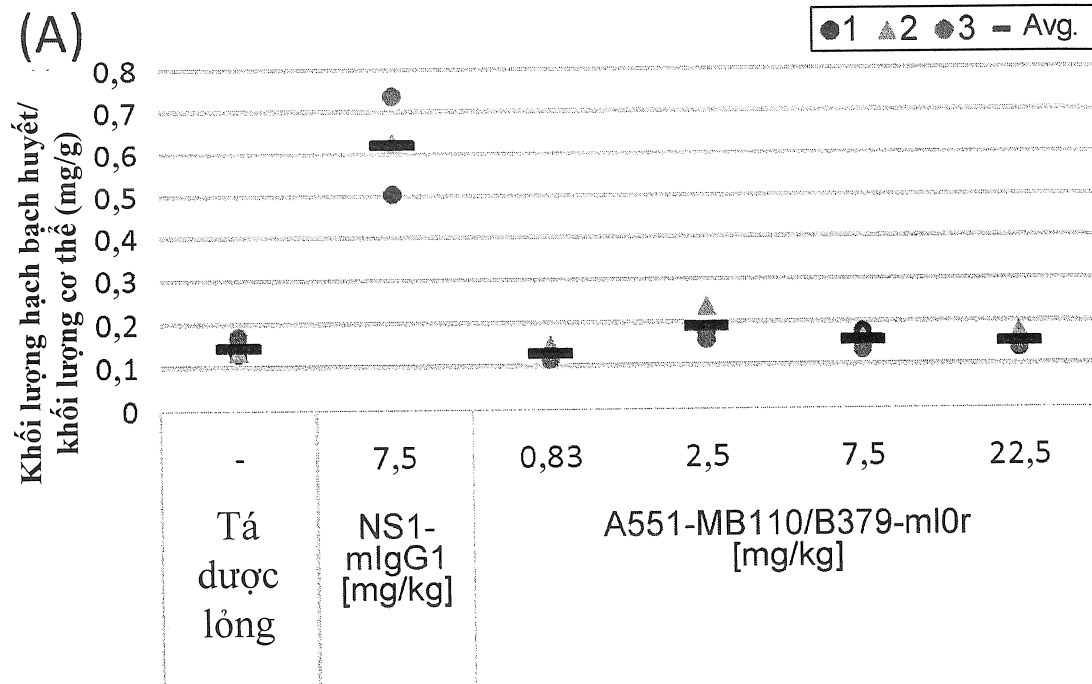


FIG. 54

55/91

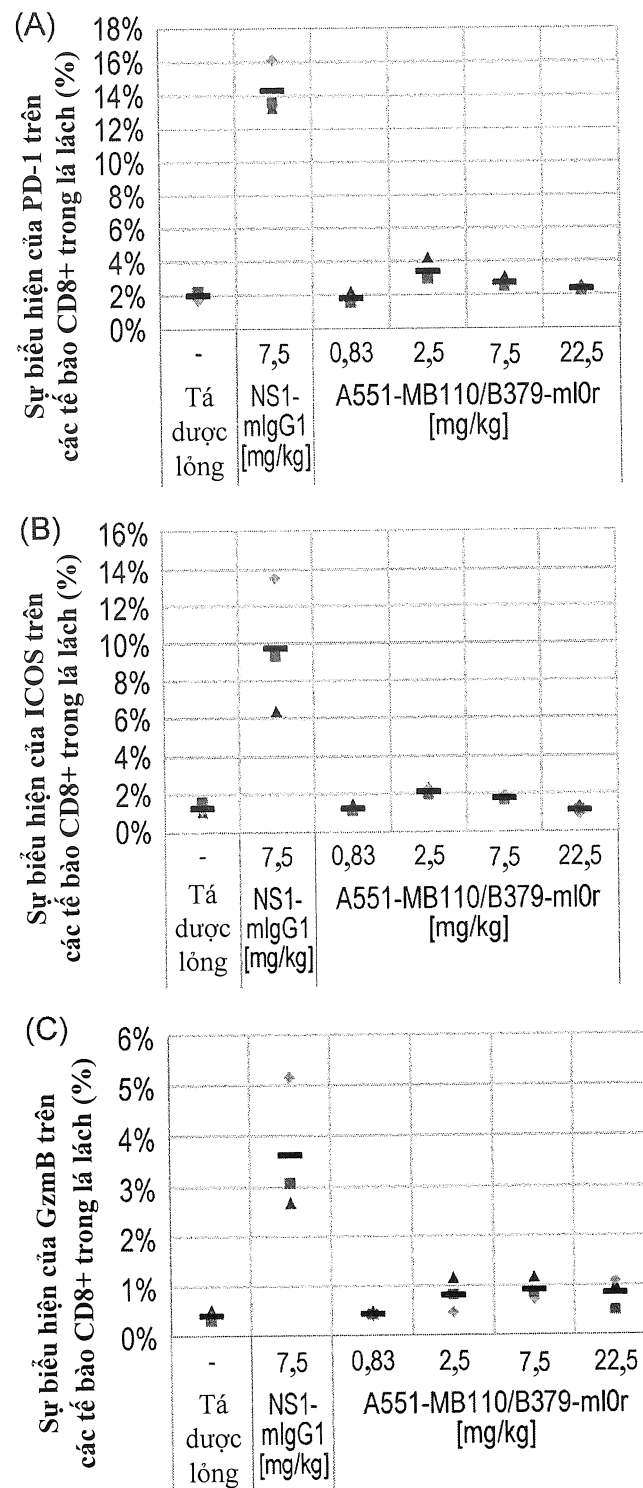


FIG. 55

56/91

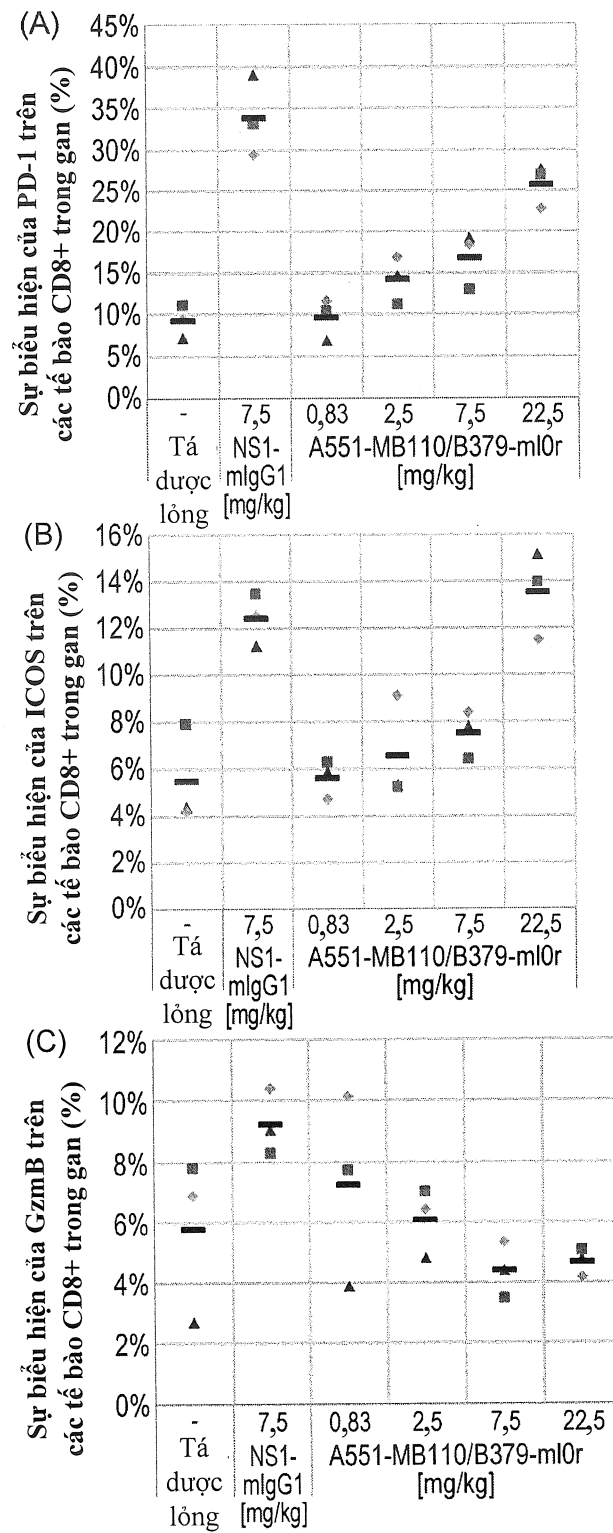


FIG. 56

57/91

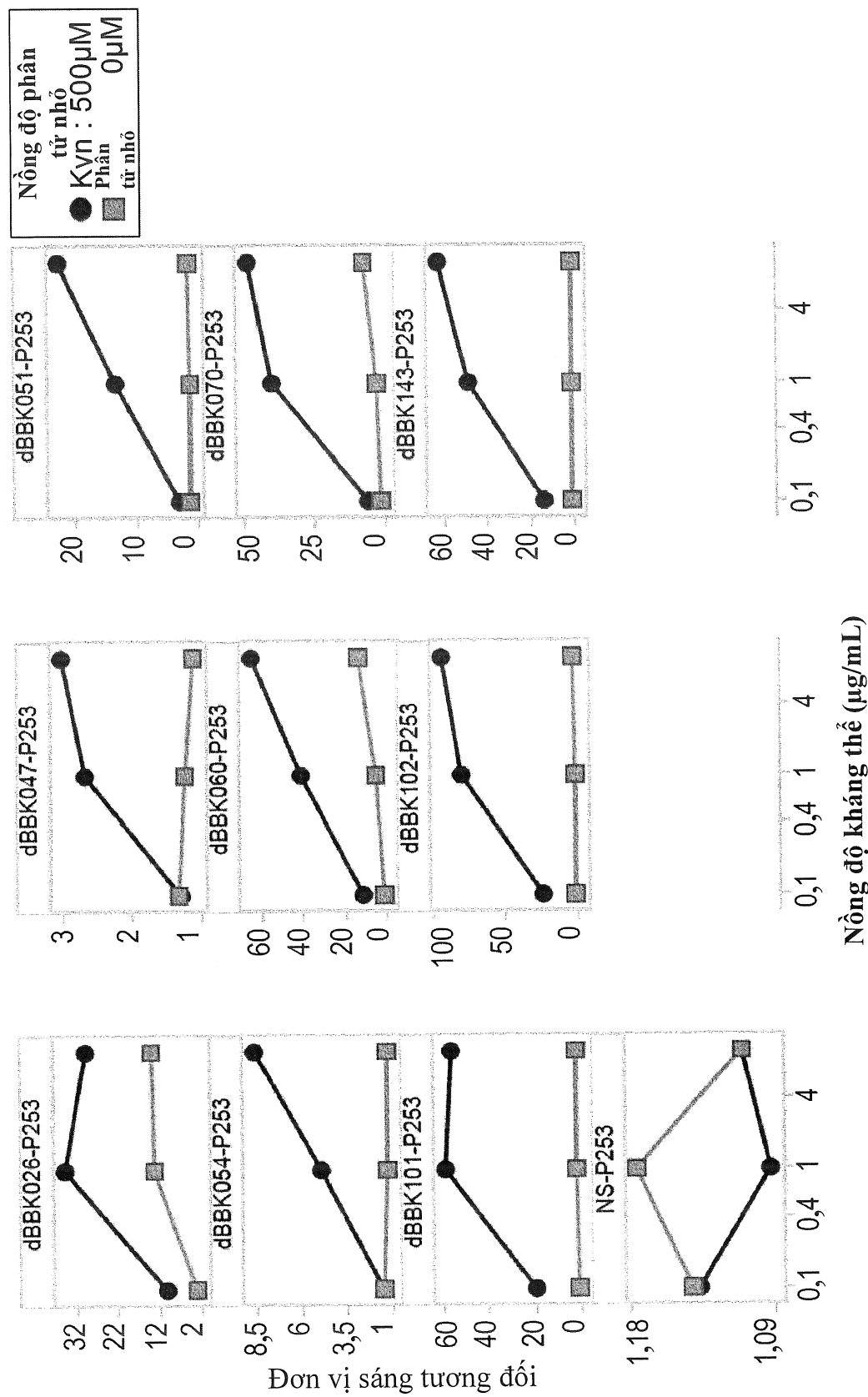


FIG. 57

58/91

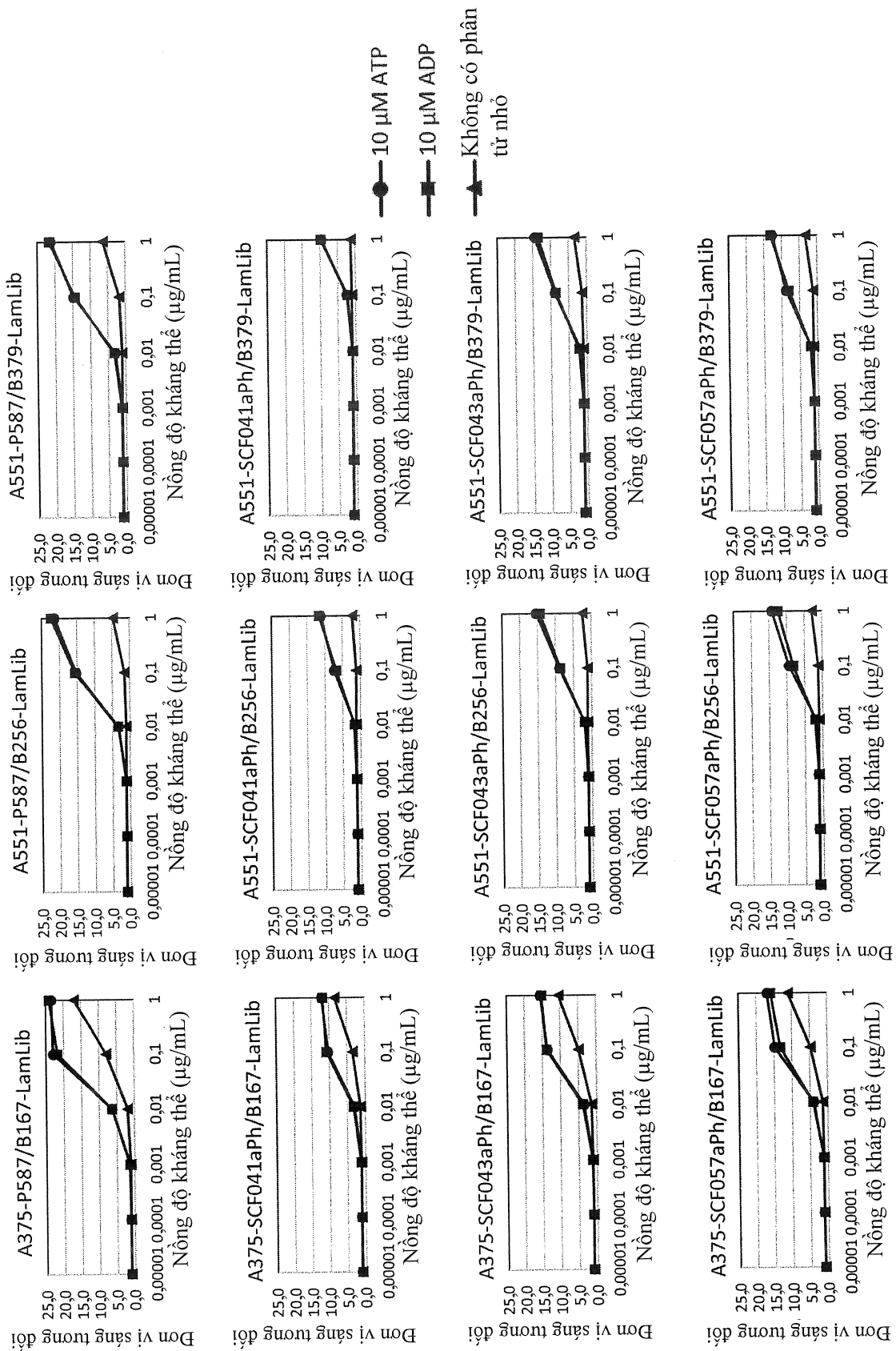


FIG. 58

59/91

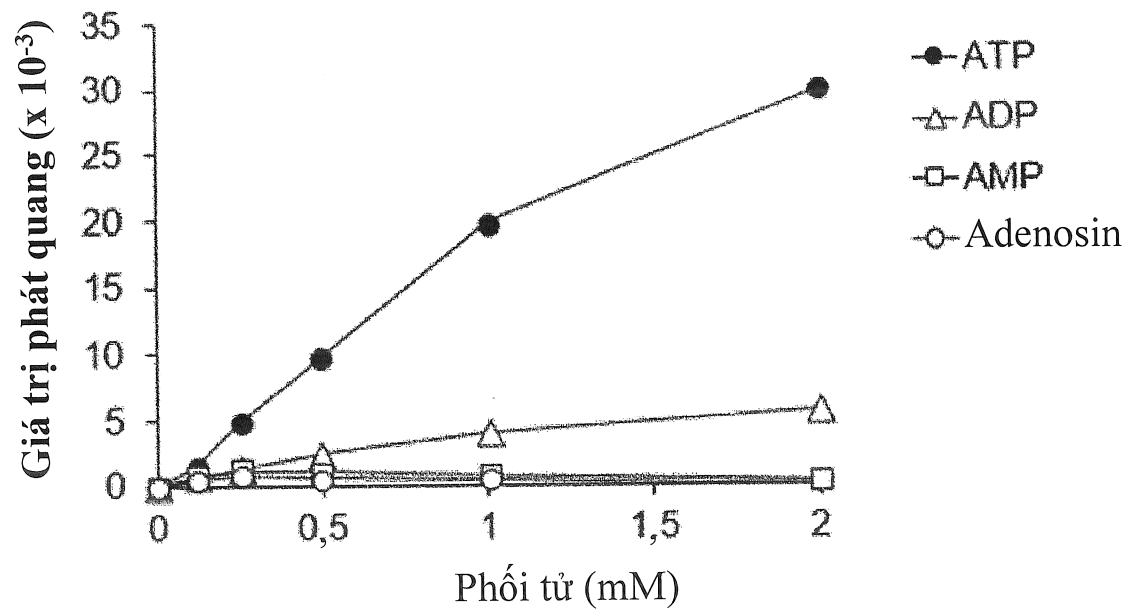


FIG. 59

60/91

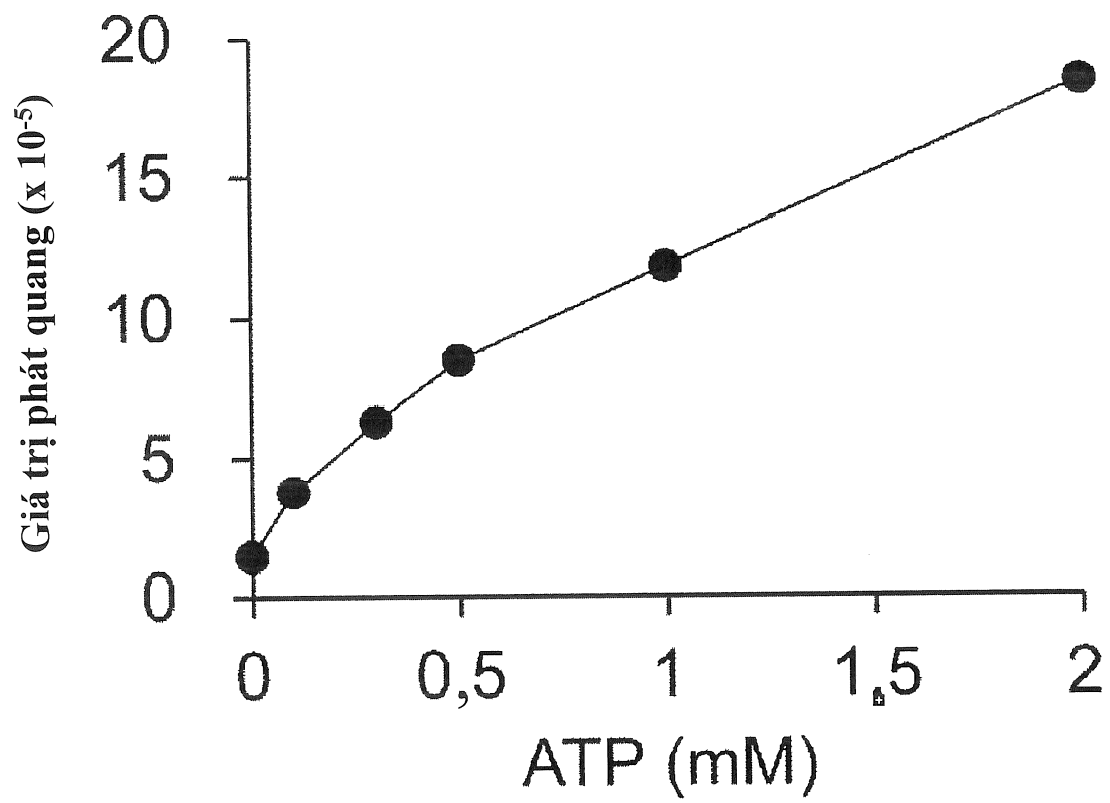


FIG. 60

61/91

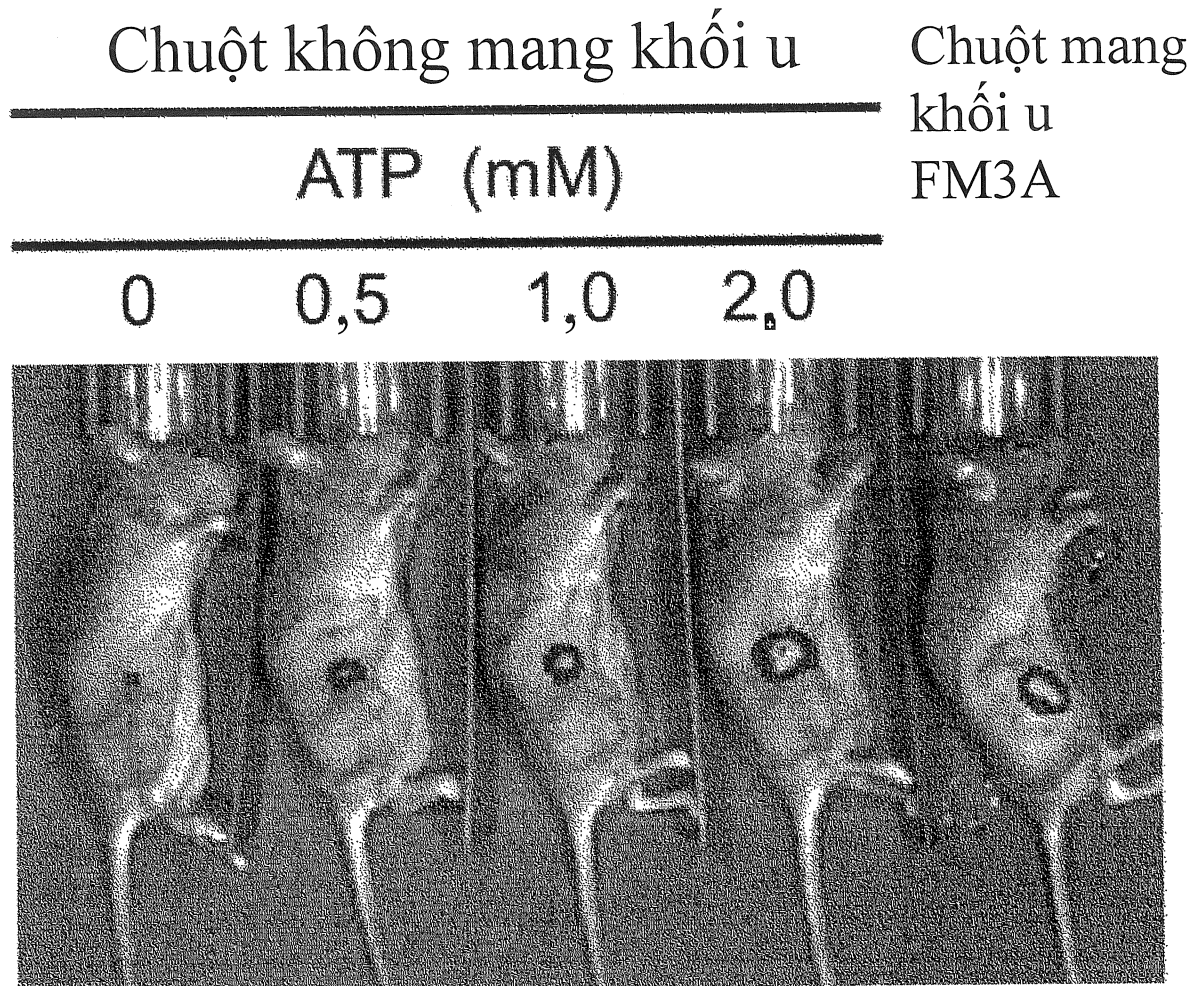


FIG. 61

62/91

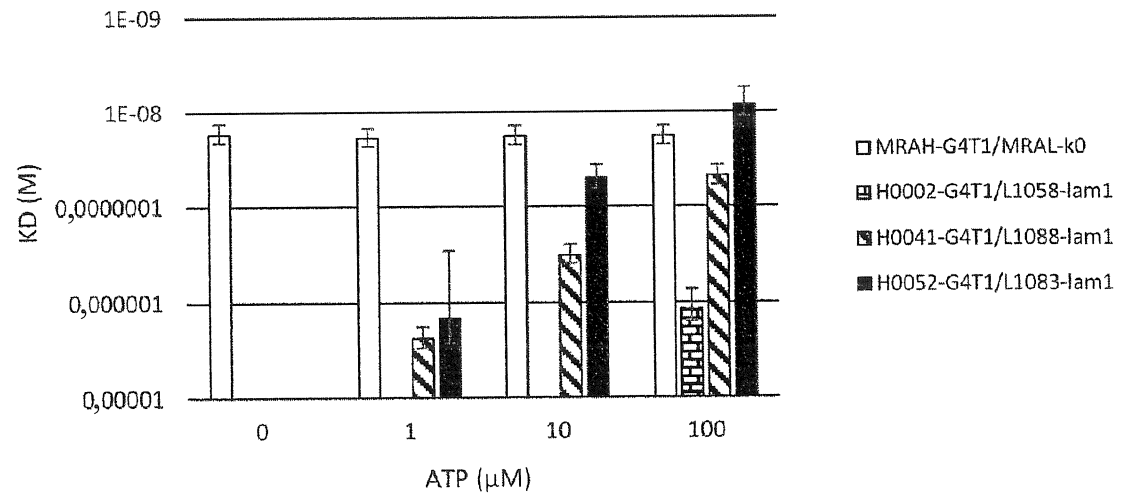


FIG. 62

63/91

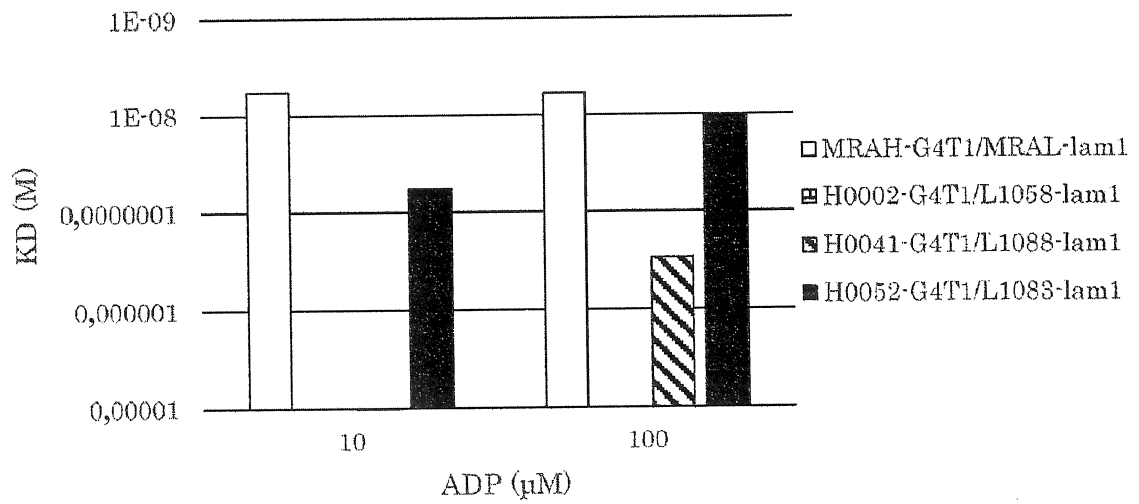


FIG. 63

64/91

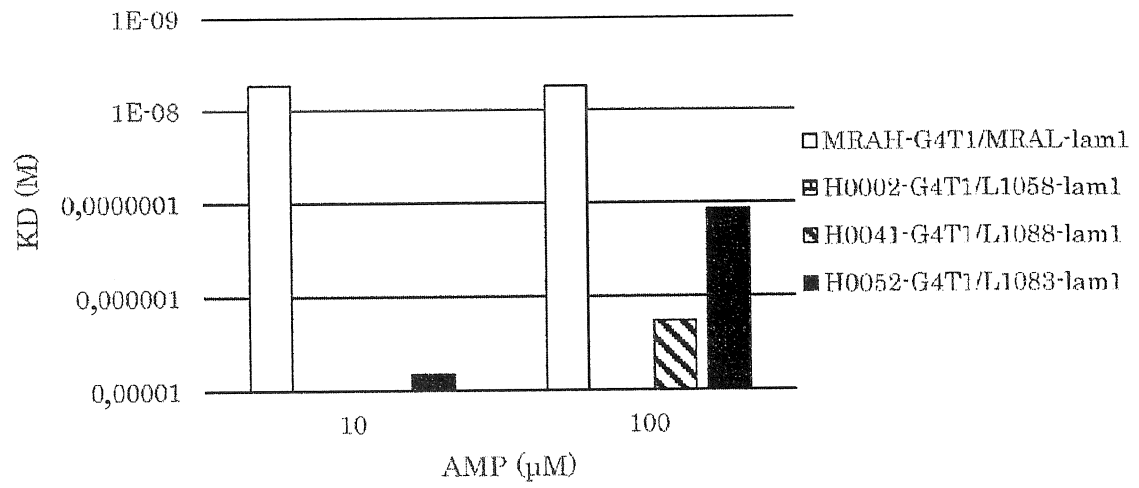


FIG. 64

65/91

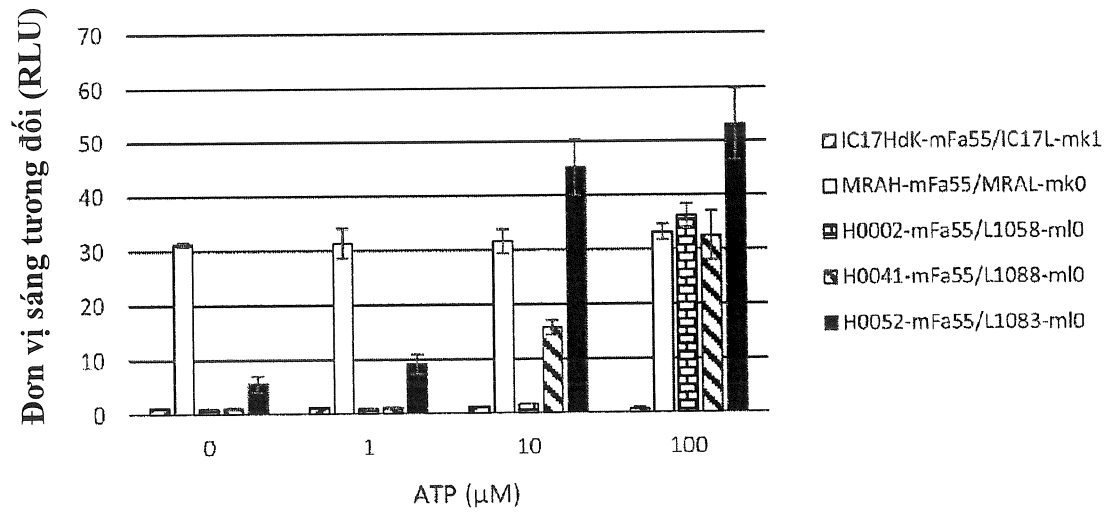


FIG. 65

66/91

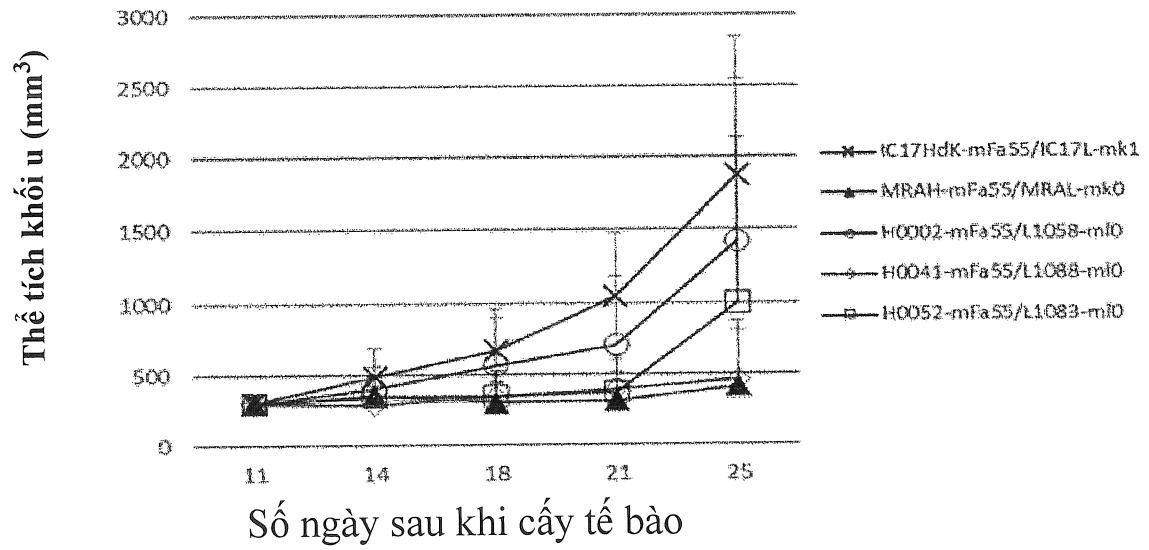


FIG. 66

67/91

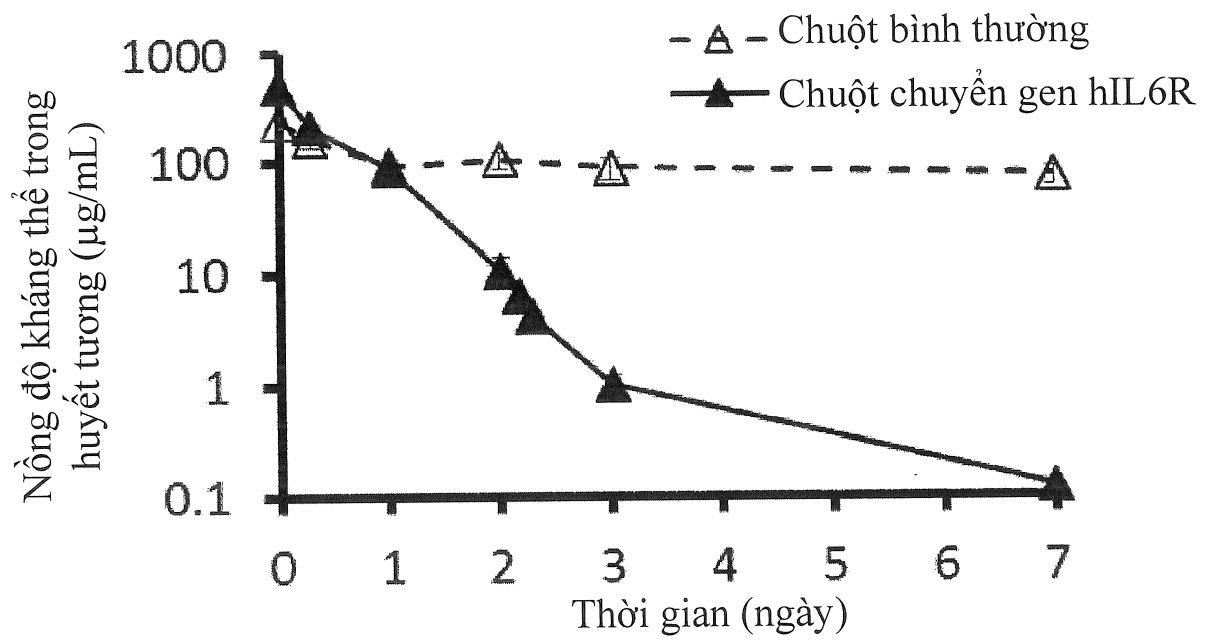


FIG. 67

68/91

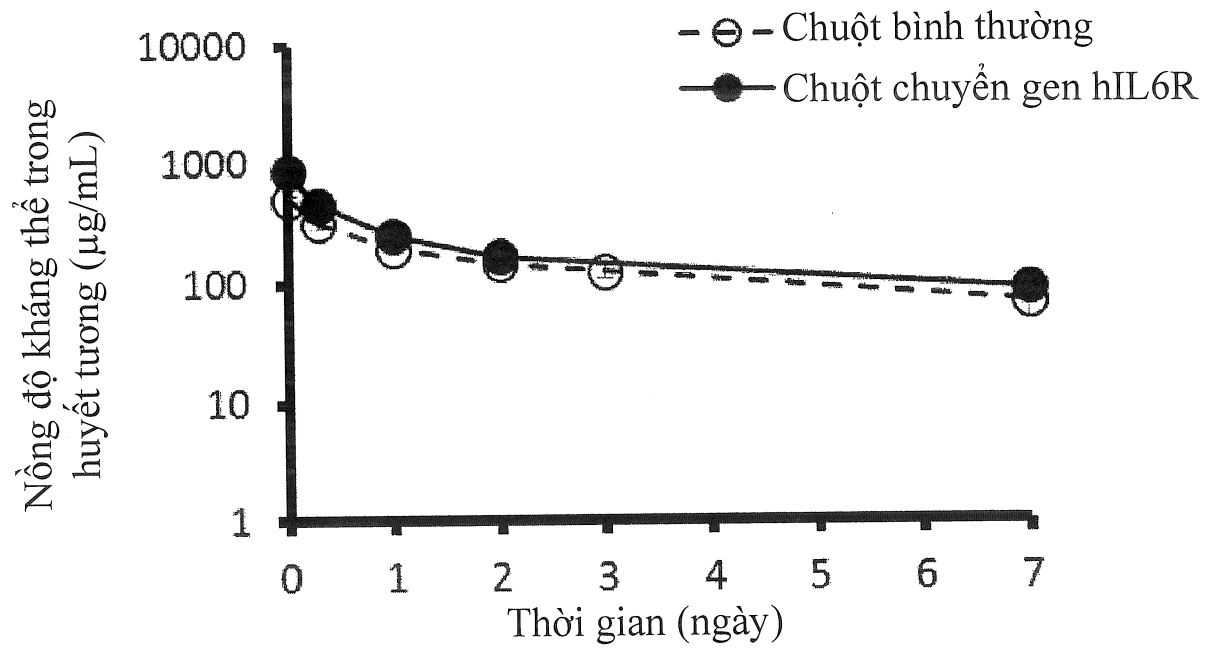


FIG. 68

69/91

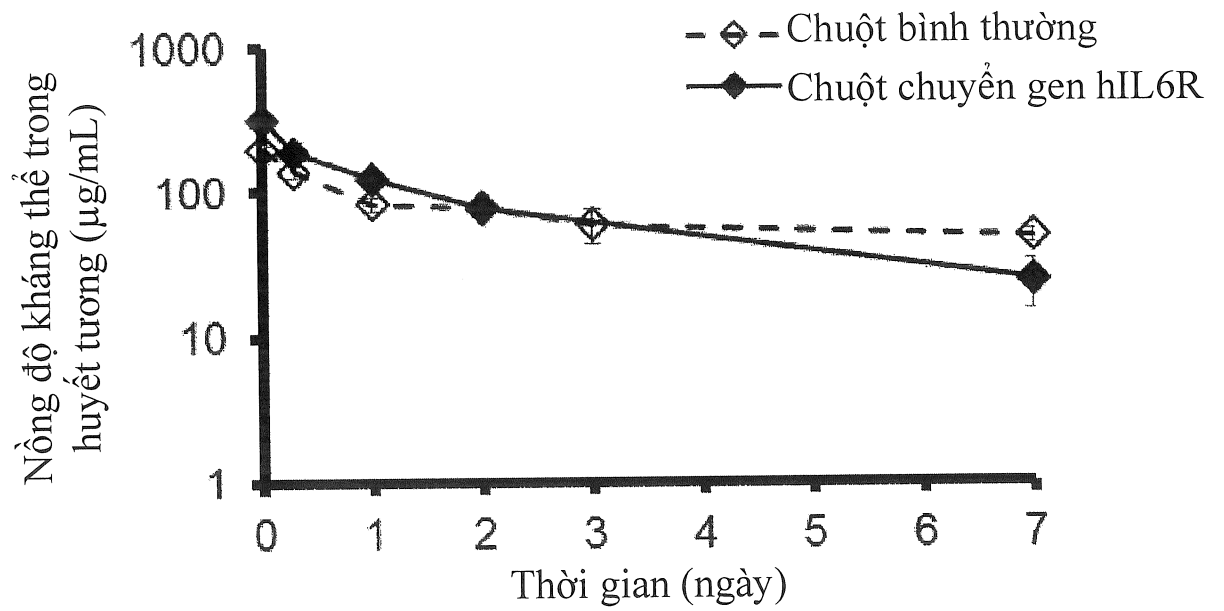


FIG. 69

70/91

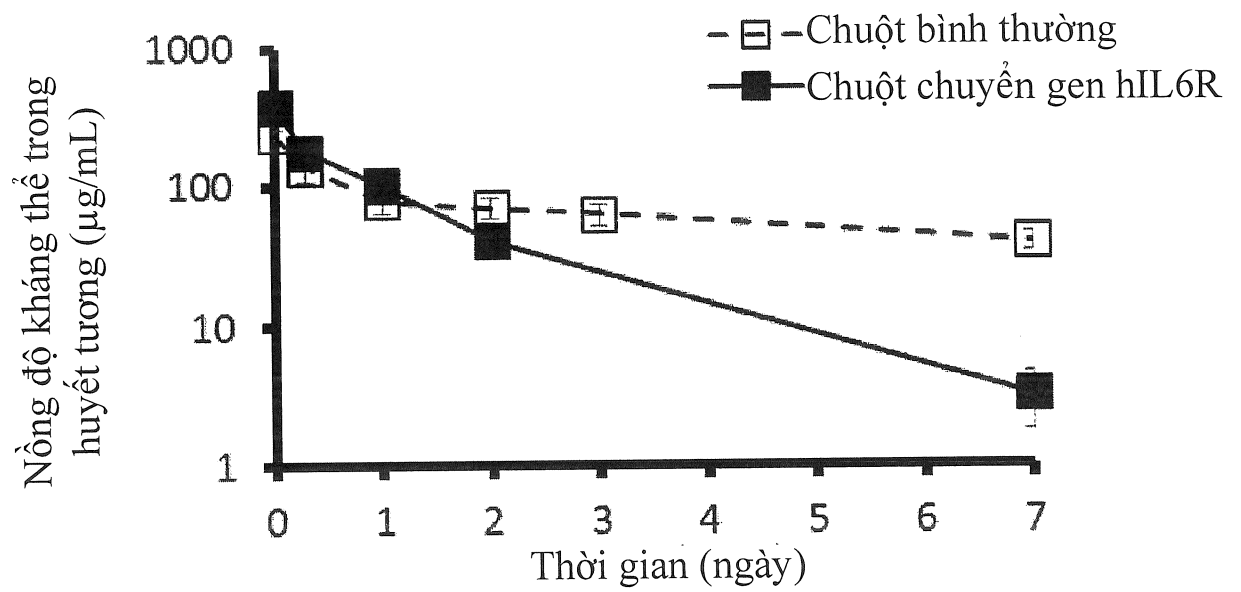


FIG. 70

71/91

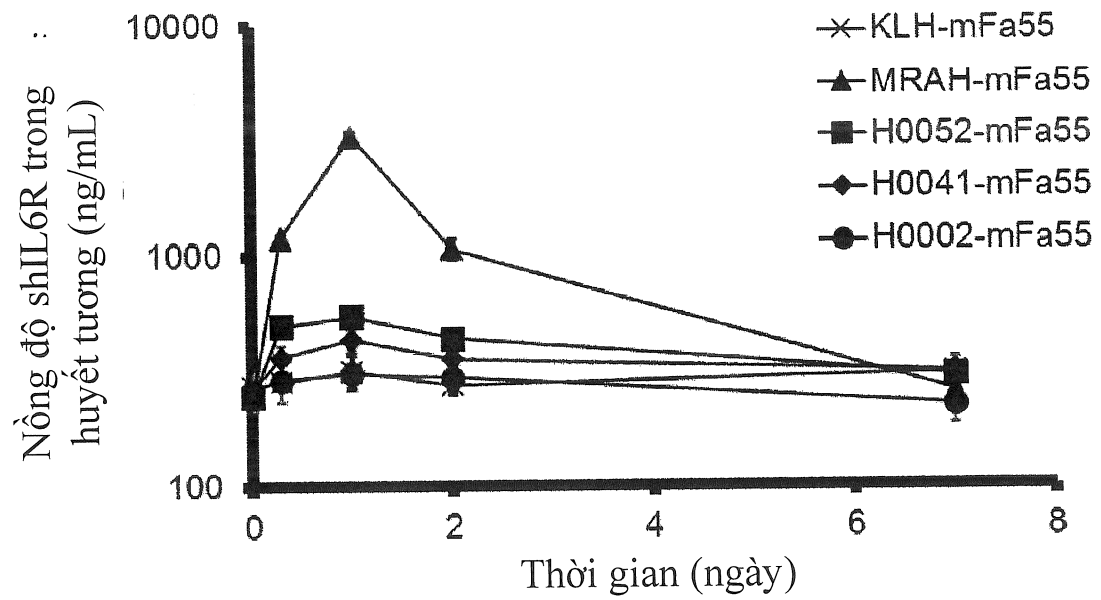


FIG. 71

72/91

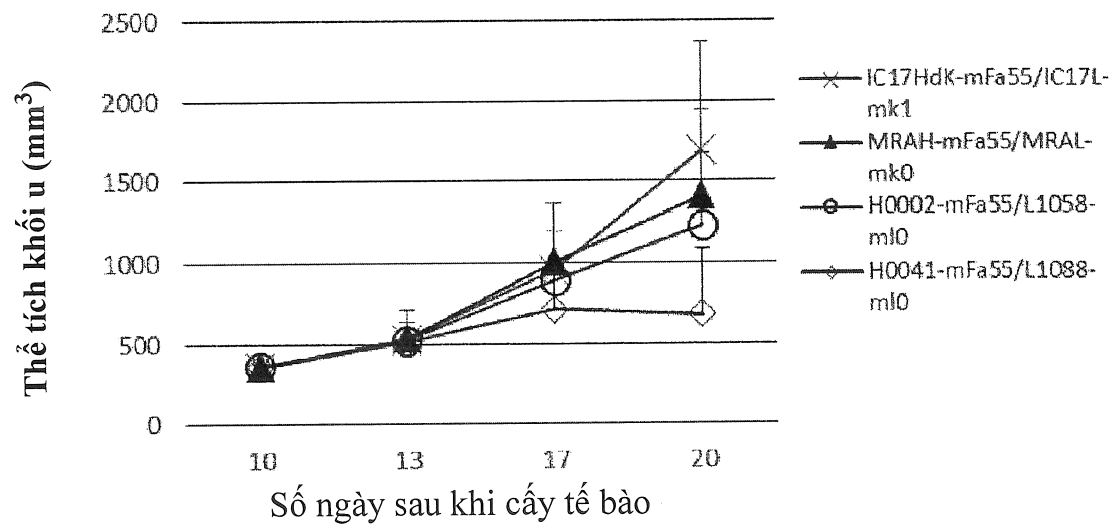


FIG. 72

73/91

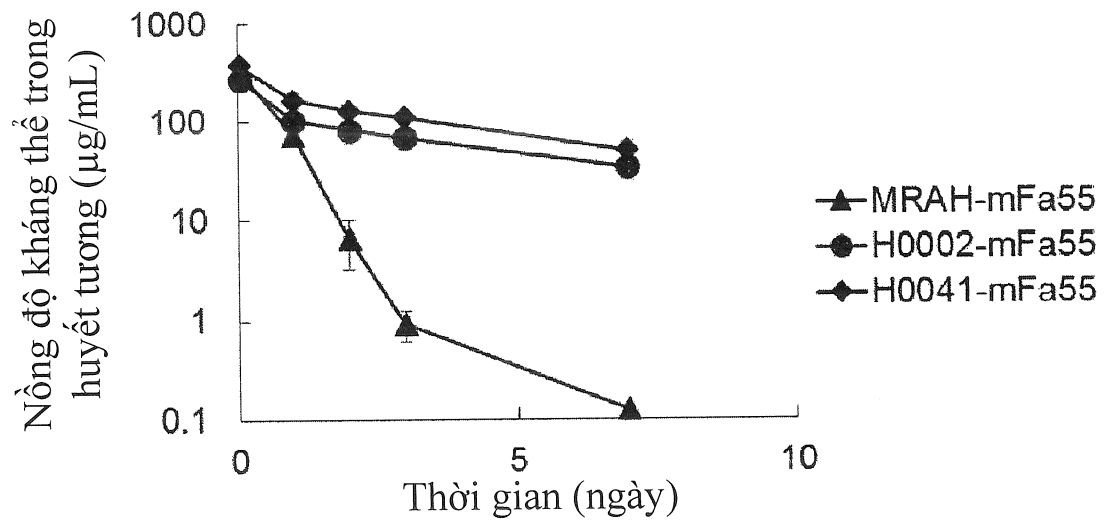


FIG. 73

74/91

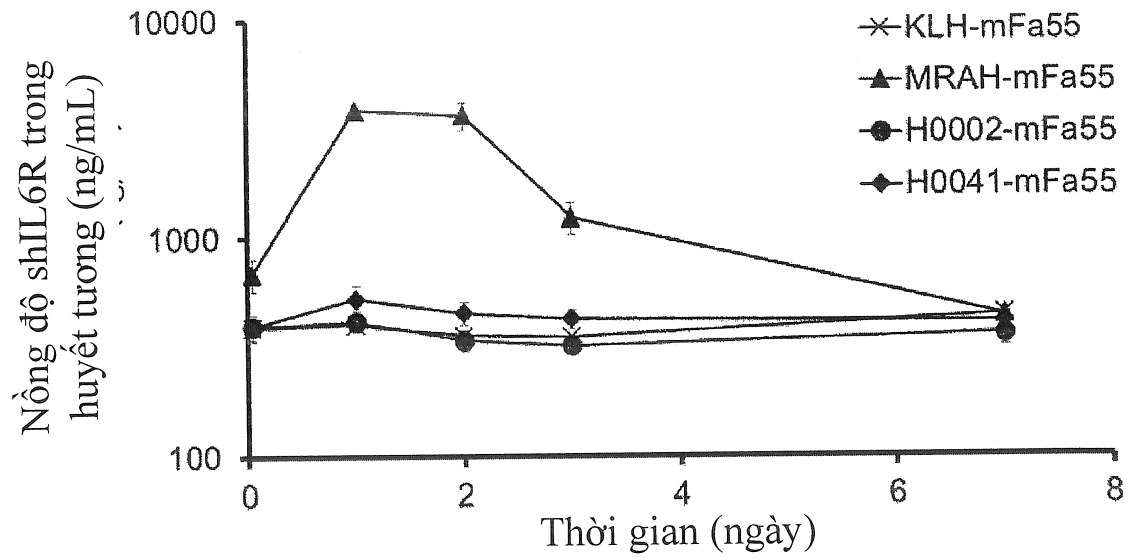


FIG. 74

75/91

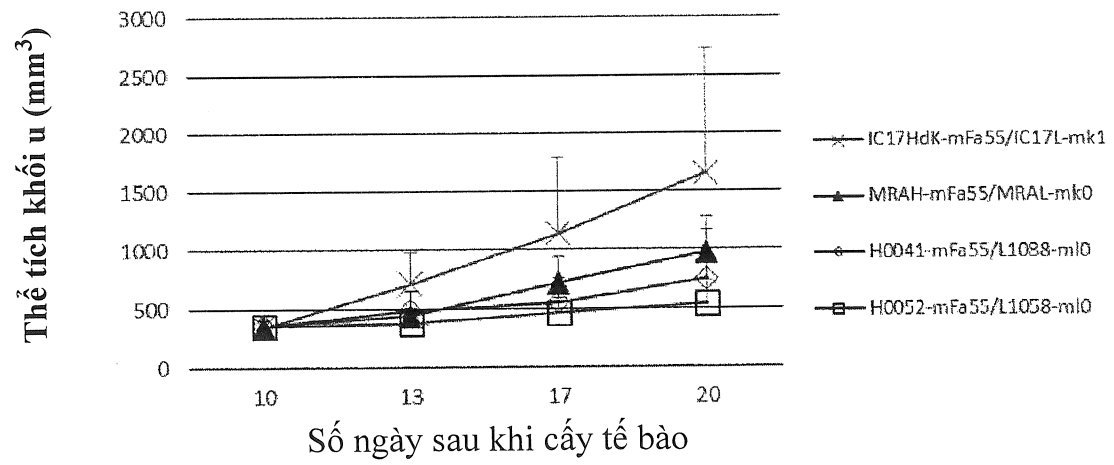


FIG. 75

76/91

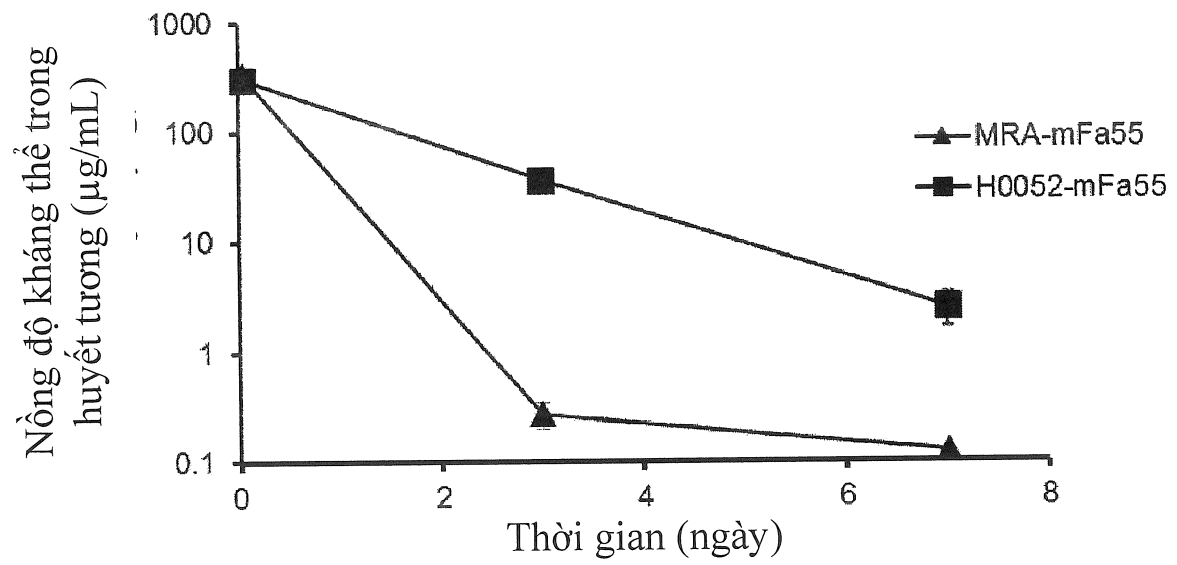


FIG. 76

77/91

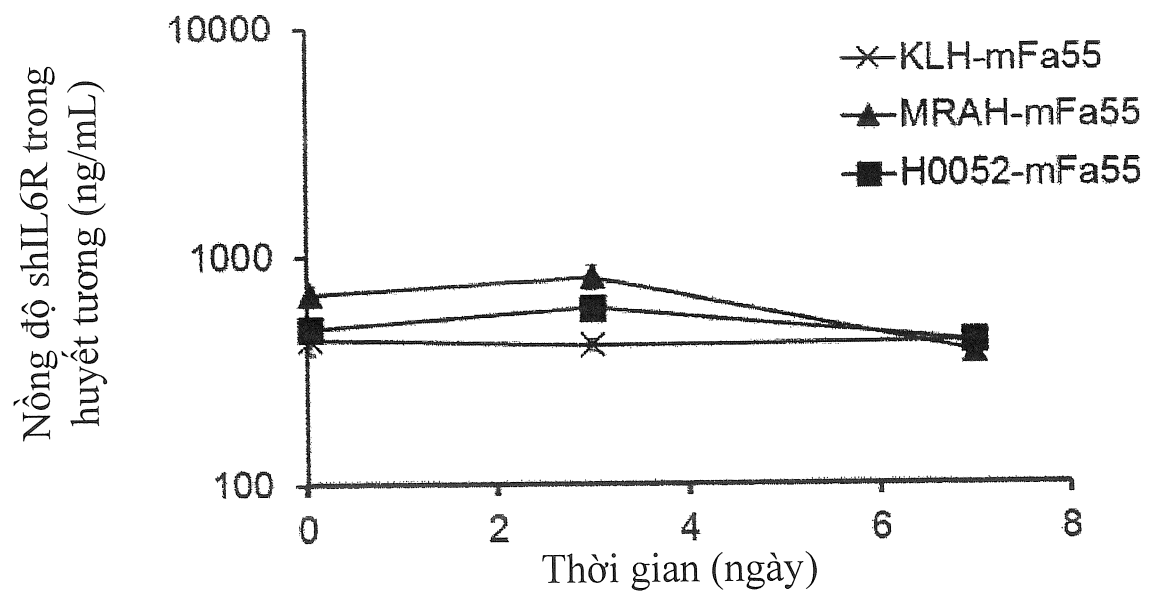


FIG. 77

78/91

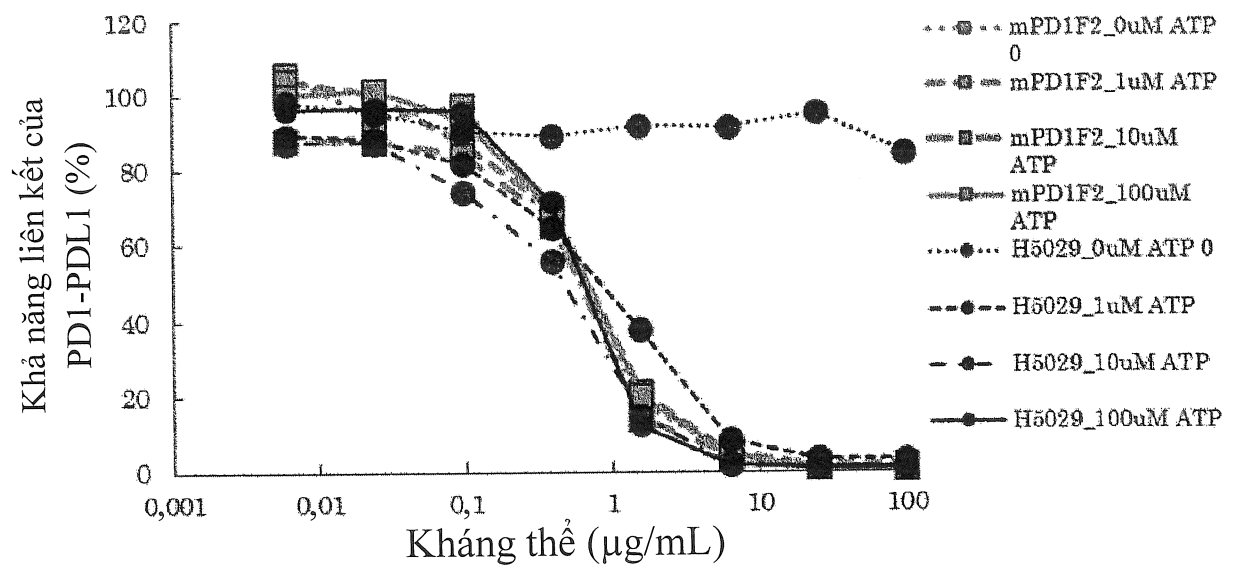


FIG. 78

79/91

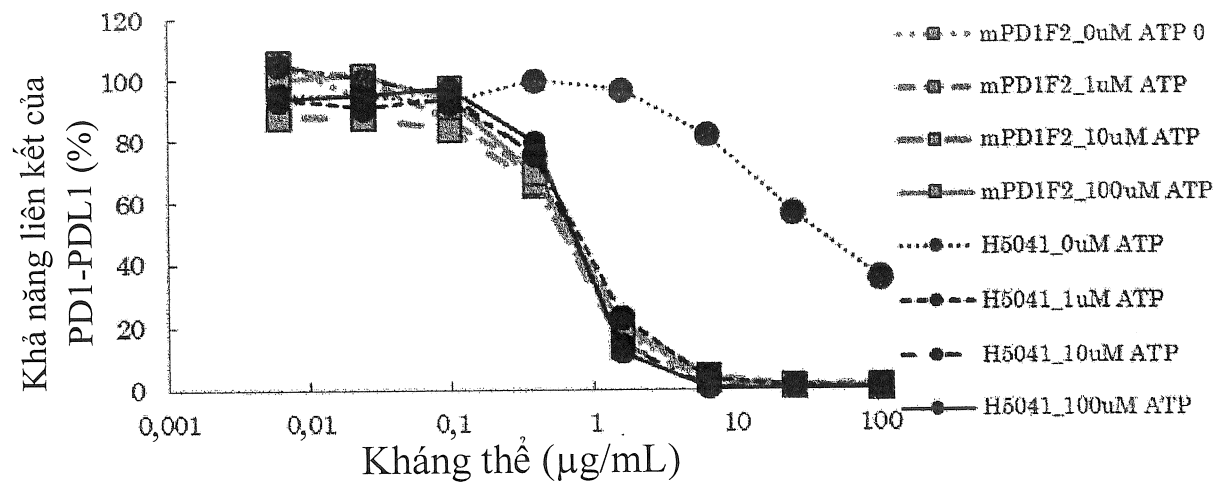


FIG. 79

80/91

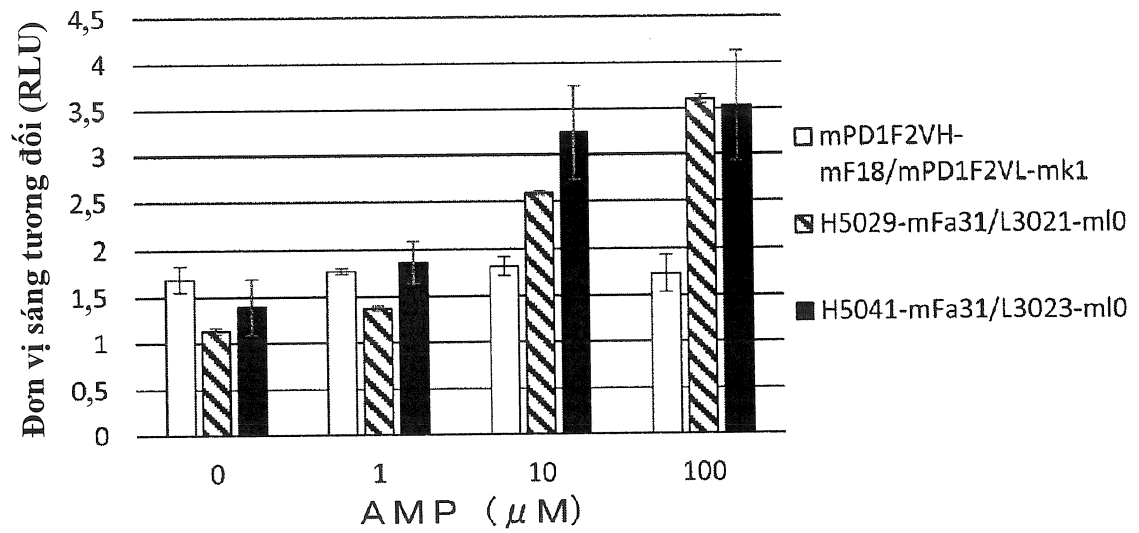


FIG. 80

81/91

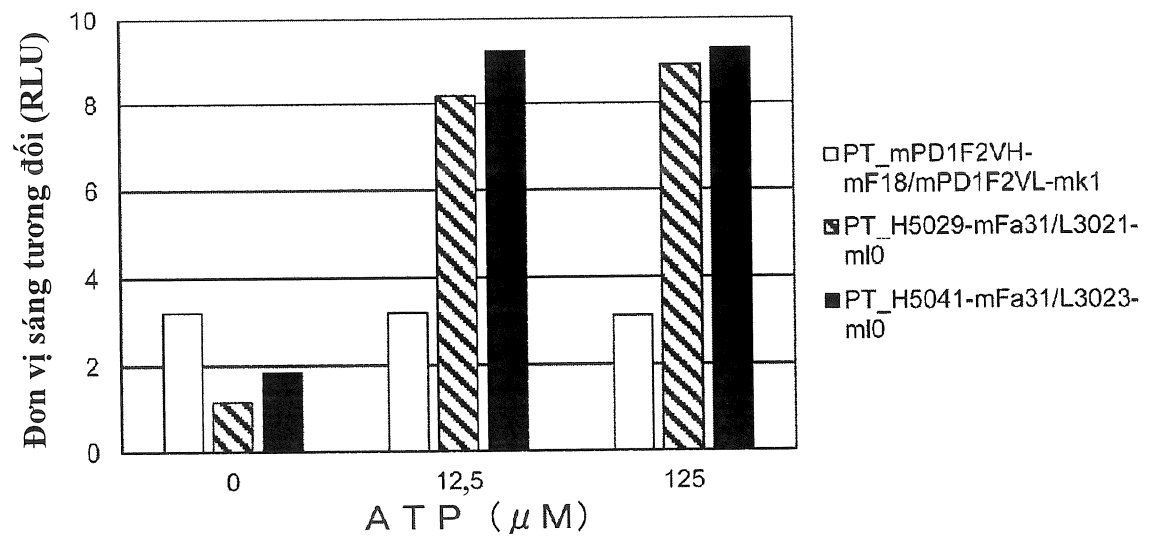


FIG. 81

82/91

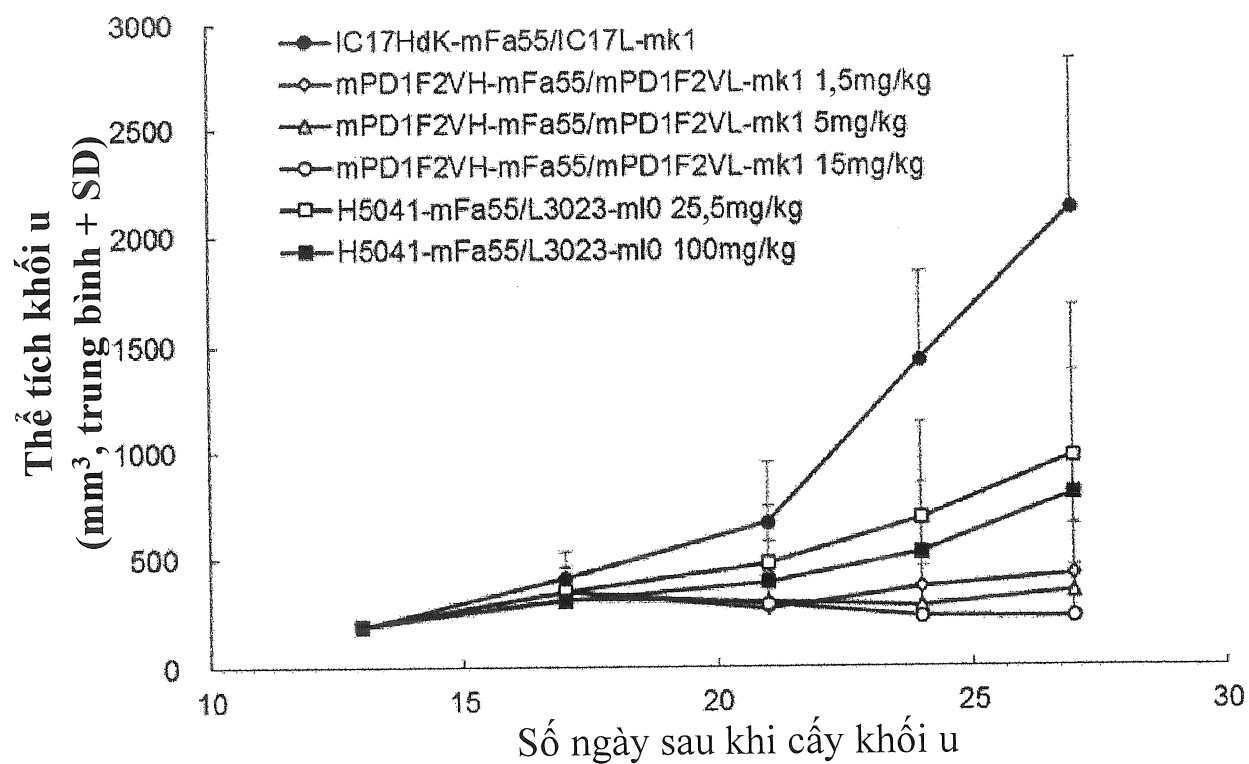
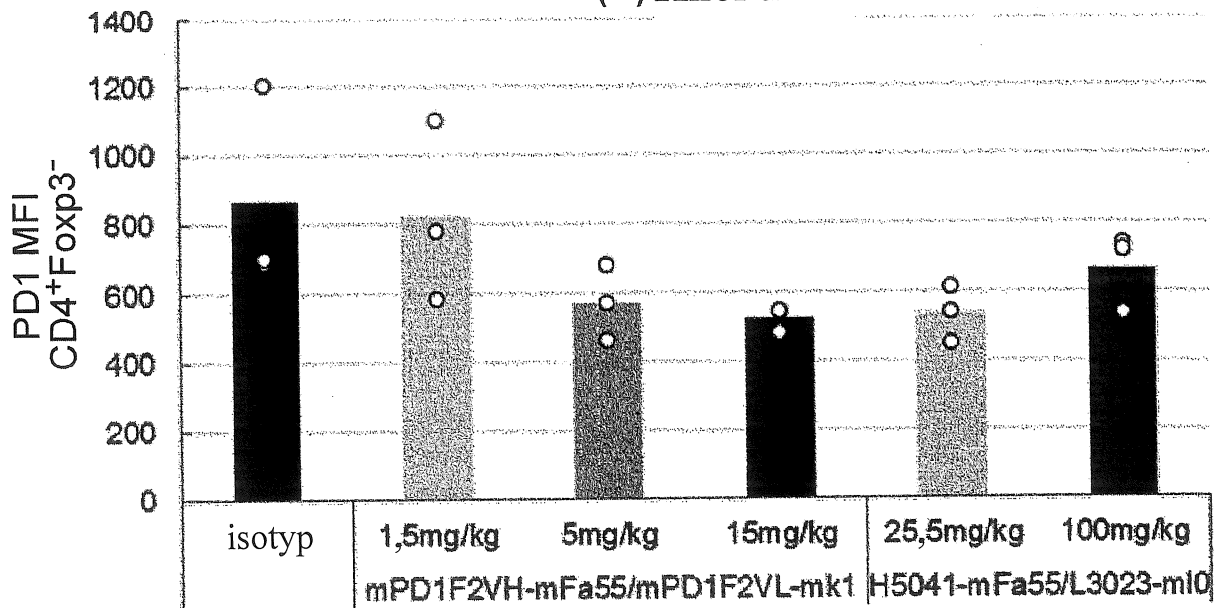


FIG. 82

83/91

(A) Khối u



(B) Lá lách

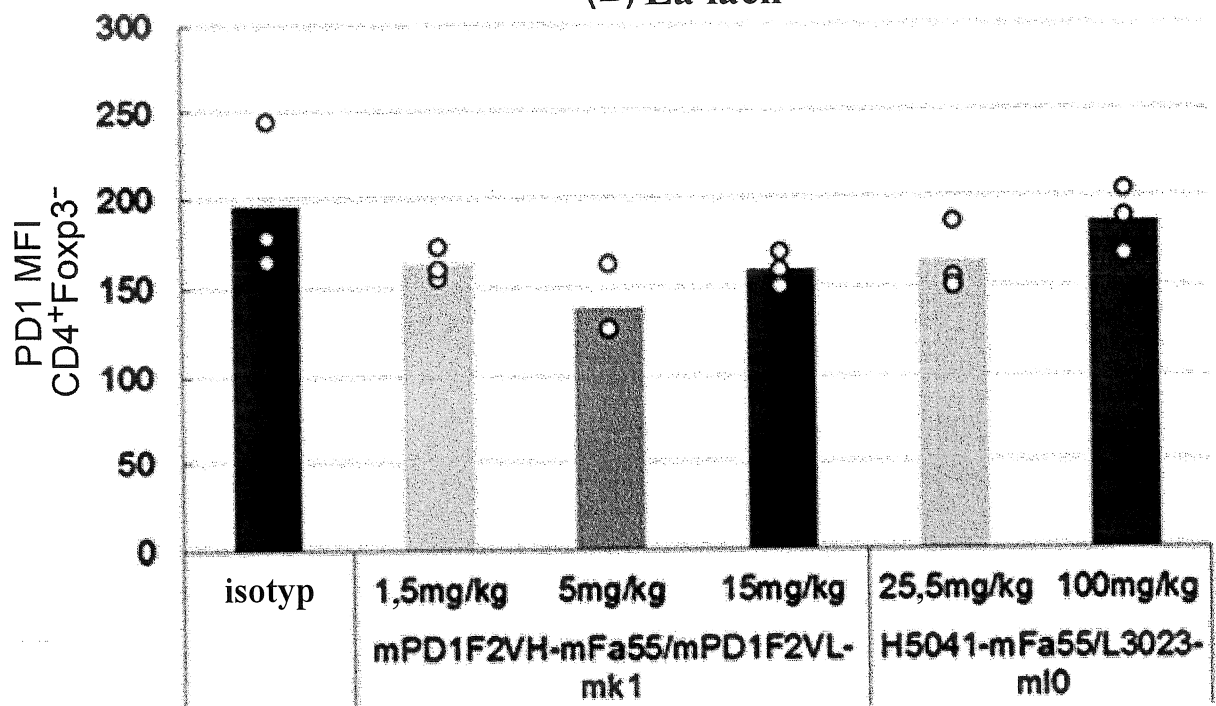


FIG. 83

84/91

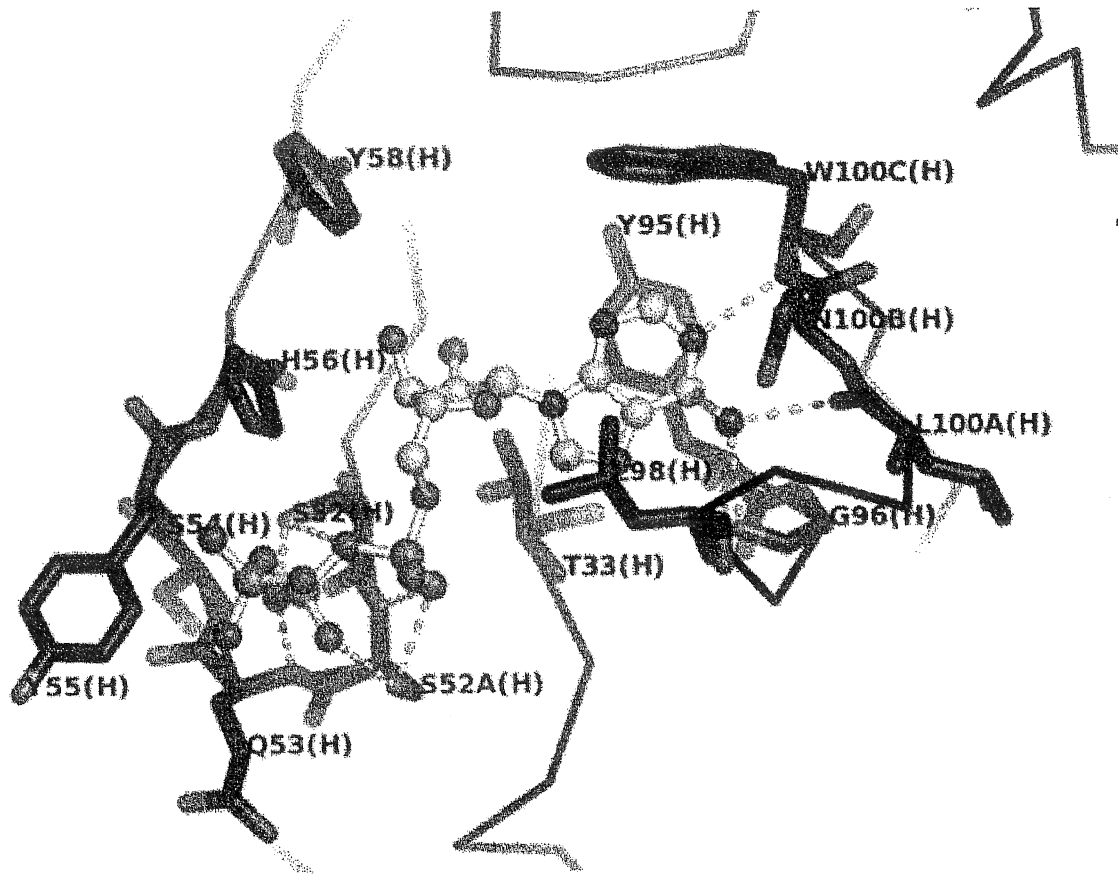


FIG. 84

85/91

shIL6R

11	12	13
1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
D V P P E E P Q L S C F R K S P L S N V V C E W Q P R S T		
14	15	16
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
P S L T T K A V L L V R K F Q N S P A E D F Q E P C Q Y S Q		
17	18	19
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
E S Q K F S C Q L A V P E G D S S F Y I V S M S V A S S V G		
20	21	22
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
S K F S K T Q T F Q G C G I L Q P D P P A N I T V T A V A R		
23	24	25
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
N P R W L S V T W Q D P H S W N S S E Y R L R F E L R Y R A		
26	27	28
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
E R S K T F T T W M V K D Q H H C V I H D A W S G L R H V		
29	30	31
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
V Q L R A Q E E F G Q G E W S E W S P E A M Q T P W T E S R		
32	30	31
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
S		

 Gốc epitop

FIG. 85

86/91

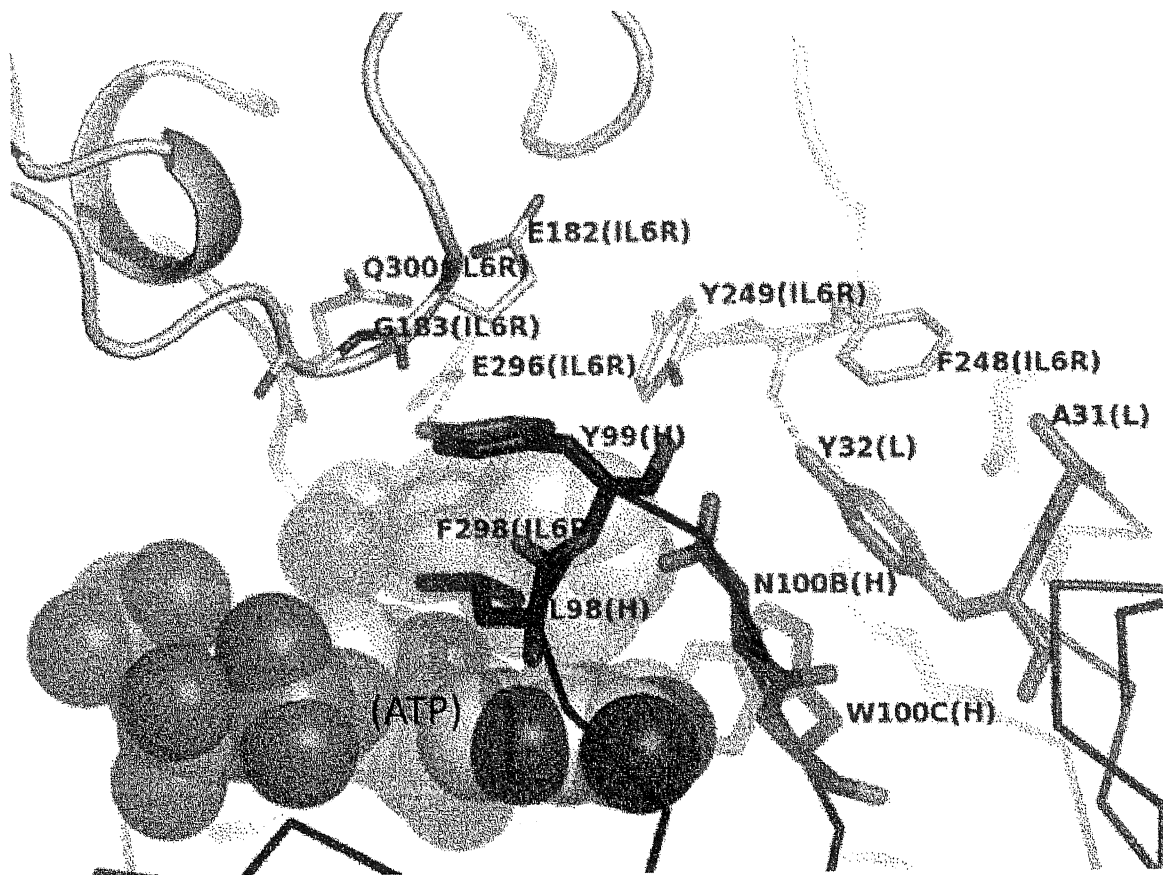


FIG. 86

87/91

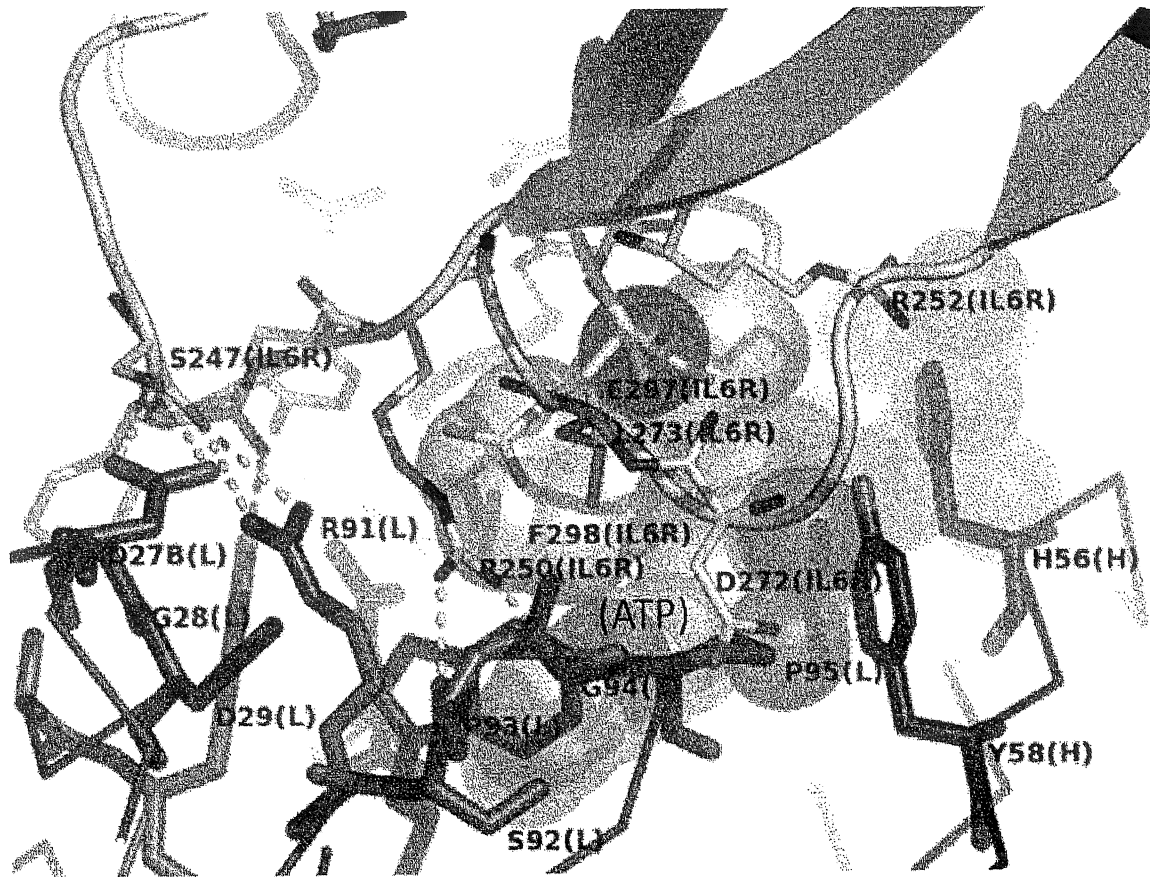


FIG. 87

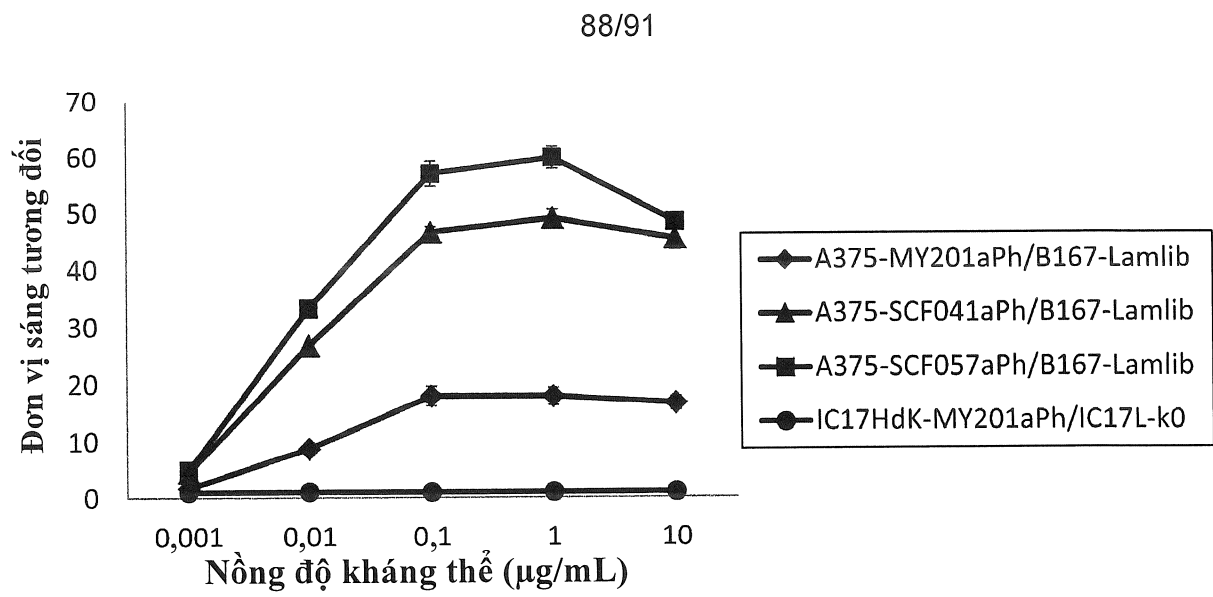


FIG. 88

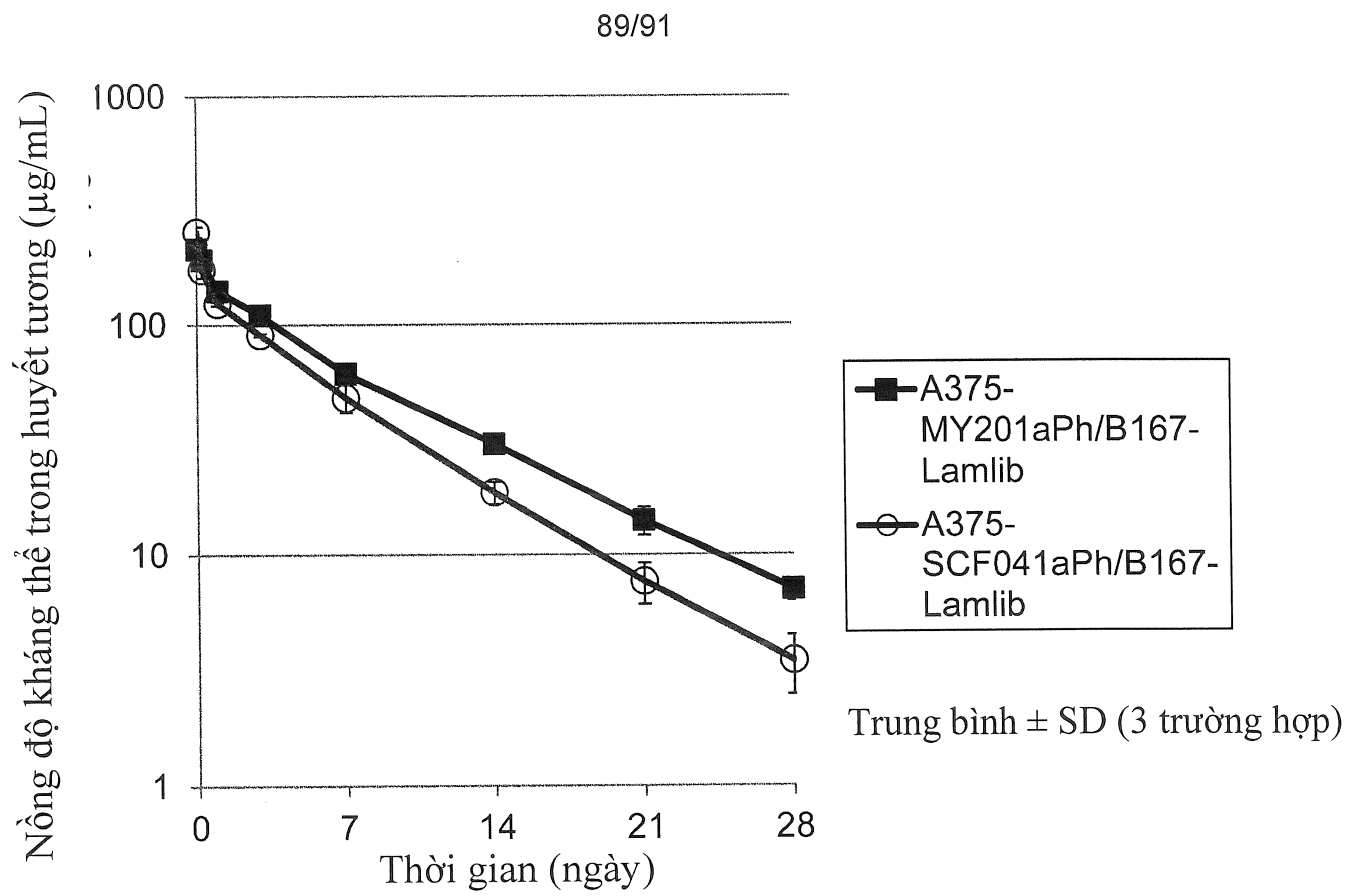


FIG. 89

90/91

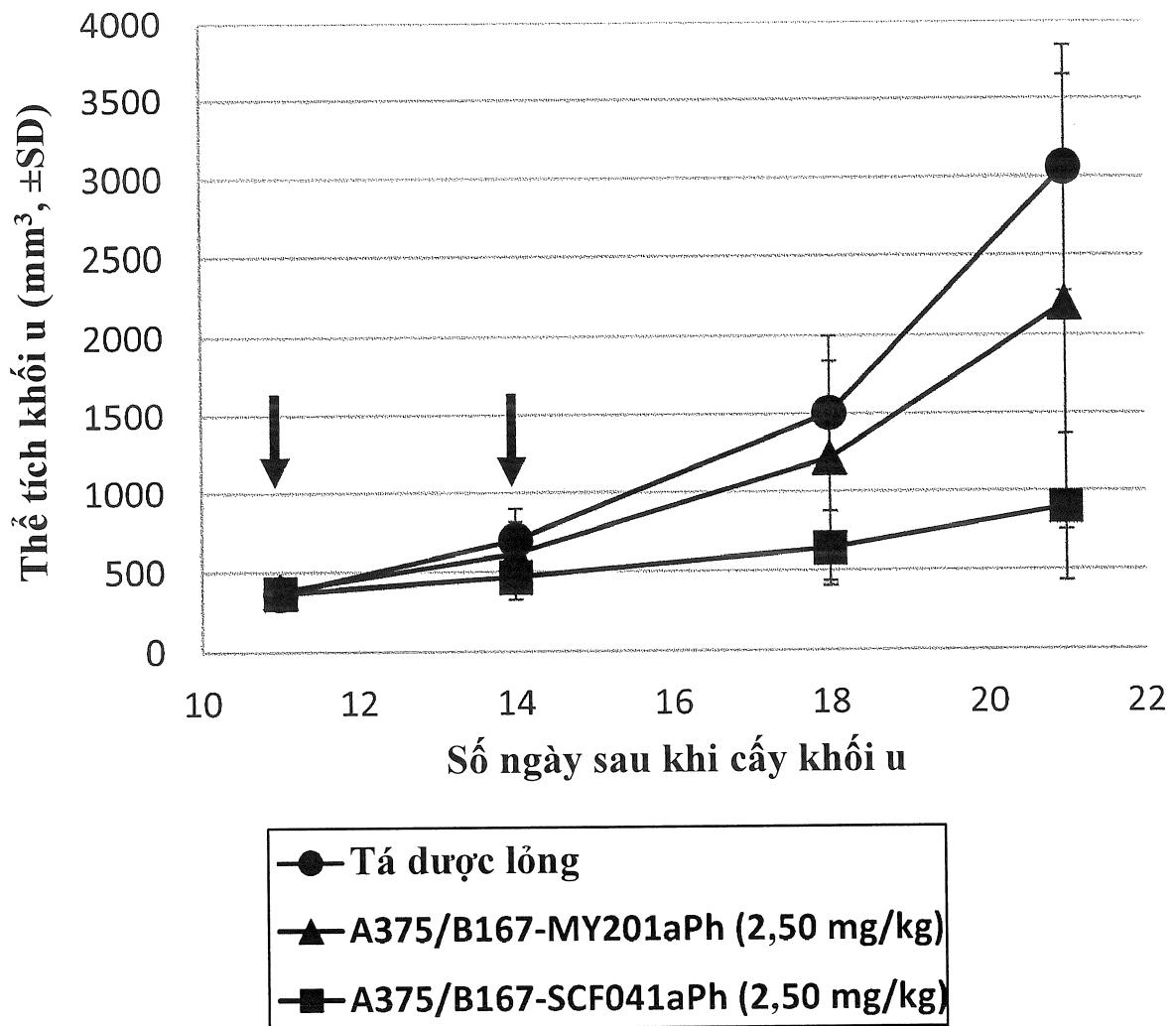


FIG. 90

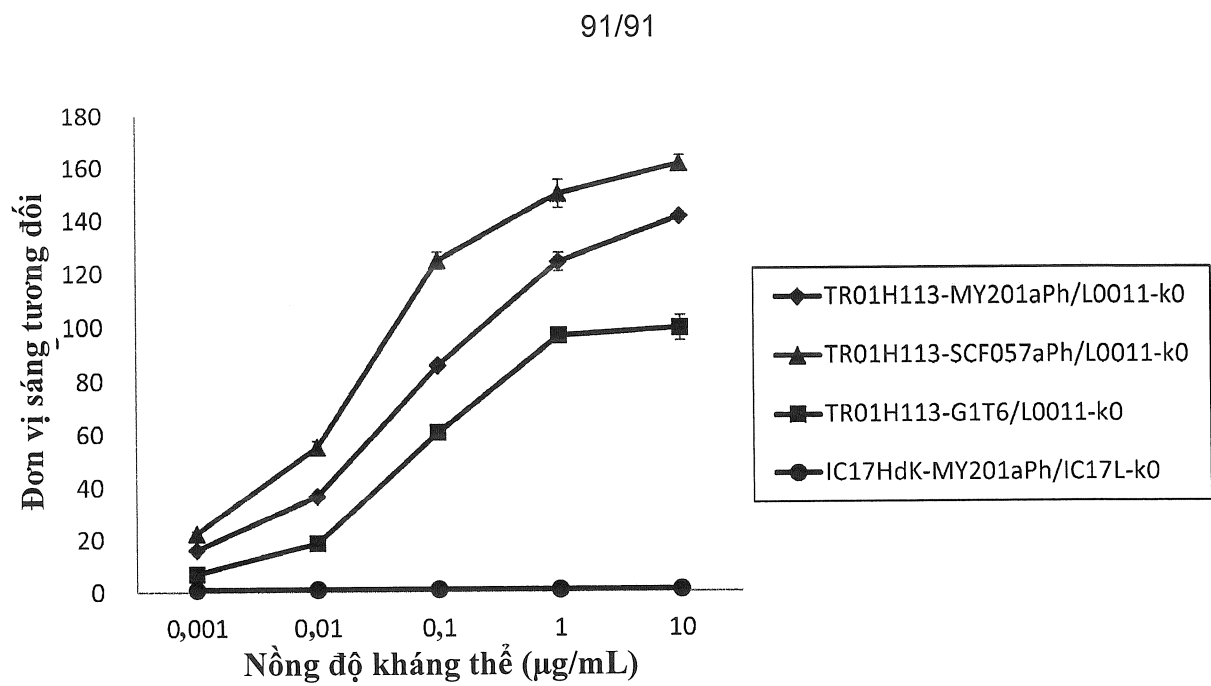


FIG. 91

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD137, AXIT NUCLEIC PHÂN LẬP, VECTƠ, TẾ BÀO CHỦ, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ KHÁNG CD137
- <130> C1-A1821P
- <150> JP 2018-152126
- <151> 2018-08-10
- <160> 225
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 255
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

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 Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 245 250 255

<210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp
 1 5 10 15

Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser

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

<210> 3
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
 20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
 35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
 50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
 65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
 85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
 100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
 115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
 130 135 140

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

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
 165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
 195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
 210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
 225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
 245 250 255

<210> 4
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg
 1 5 10 15

Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser
 20 25 30

Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr
 35 40 45

Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu
 50 55 60

Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu
 65 70 75 80

Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr
 85 90 95

Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg
 100 105 110

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly
 115 120 125

Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser
 130 135 140

Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His
 145 150 155 160

Ser Leu Gln Val Leu
 165

<210> 5
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 5

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 Leu Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser 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 Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly
 85 90 95

Ala Glu 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 Ala Thr Pro Pro Ala
 165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Phe Phe Leu Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Thr Val Val Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Val Leu Arg
 195 200 205

Phe Ser Val Val Lys Arg Ser Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 210 215 220

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 225 230 235 240

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 245 250

<210> 6
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 6

Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp
 1 5 10 15

Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser
 20 25 30

Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly
 35 40 45

Val Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
 50 55 60

Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys
 65 70 75 80

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
 85 90 95

Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
 100 105 110

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
 115 120 125

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

Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
 145 150 155 160

His Ser Pro Gln Ile
 165

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 7

Thr Phe Thr Met Asn

1

5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 8

Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Lys
1				5					10					15	

Val

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 9

Ser	Ile	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Lys
1				5					10					15	

Val

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 10

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 11

Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
 1 5 10 15

Val

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 12

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
 1 5 10 15

Leu

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 13

Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Ser	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 14

Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Ala	Glu	Gln	Phe	Lys
1				5					10					15	

Val

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 15

Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ser	Phe	Lys
1				5					10					15	

Val

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 16

Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Lys
1				5					10					15	

Val

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 17

Tyr	Gly	Ala	Lys	Asn	Phe	Leu	Asn	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 18

Tyr	Gly	Pro	Lys	Asn	Glu	Leu	Asn	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 19
<211> 13
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 19

Tyr	Gly	Lys	Lys	Asn	Glu	Leu	Asn	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 20

Tyr	Gly	Ile	Lys	Asn	Glu	Leu	Asn	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 21

Thr	Gly	Thr	Arg	Tyr	Asp	Val	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 22

Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 23

Thr Gly Thr Arg Thr Asp Val Gly Phe Tyr Glu Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 24

Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr Glu Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 25

Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Tyr Tyr Glu Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 26

Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser
1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 27

Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu His Gln Val Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 28

Ser Ser Tyr Arg Tyr Pro His Ile Val Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 29

Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu Ala Gln Val Ser
 1 5 10

<210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be Lys, His or Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be Ser or Gly

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be Thr or Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa can Glu or Tyr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa can be Asp or Glu

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa can be Ser or Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa can be Val, Gly or Leu

<400> 30

Ser Ile Ser Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ile Xaa Tyr Ala Xaa Xaa Phe Lys
 1 5 10 15

Xaa

<210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Ala, Pro, Lys or Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be Phe or Glu

<400> 31

Tyr Gly Xaa Lys Asn Xaa Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be Arg or Ser

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be Tyr or Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can be Tyr or Phe

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa can be Glu or Asn

<400> 32

Thr Gly Thr Xaa Xaa Asp Val Gly Xaa Tyr Xaa Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be Glu or Pro

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be His or Ala

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be Gln or Ile

<400> 33

Ser Ser Tyr Arg Tyr Xaa Xaa Xaa Val Ser
 1 5 10

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 34

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

Gly

<210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 37

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 39

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 40

Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr
1				5					10					15

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

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 41

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser
1				5					10					15	

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

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 42

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu
1				5					10

21

<210> 43
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 43

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
 50 55 60

Lys Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 44

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser His Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
 50 55 60

Lys Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 45

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 46

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 47

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

25

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 48

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

Lys Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Pro Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 49

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Phe
 50 55 60

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 50

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Gln Phe
 50 55 60

Lys Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Lys Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 51

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Ser Phe
 50 55 60

Lys Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 52

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

Lys Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 53

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Gln Phe
50 55 60

Lys Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 54

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

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

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

32

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

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 56

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

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

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Pro
 85 90 95

His Ile Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 57
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 57

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

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

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

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

<210> 58

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 58

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Arg Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
 85 90 95
 His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

 <210> 59
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

 <400> 59

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

 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

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

 Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
 85 90 95

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

<210> 60

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 60

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Tyr Tyr
 20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
 85 90 95

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

<210> 61

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 62
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 63
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

40

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 64

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 64

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 65
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 66

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 66

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
45

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

<210> 67
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

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

<210> 68

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 68

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	

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

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			

Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80

Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	

Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		

Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Trp	Asn	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			

Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160

Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

165 170 175
 Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 69
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 69

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu

180 185 190
 His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 70

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 70

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu
180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195	200	205
Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	325	

<210> 71
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 71

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 55

210 215 220
 Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 72
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

58

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

62

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325
 <210> 76
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <400> 76
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290

295

300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 77

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 77

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305

310

315

320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 78

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 78

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 79
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 79

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 80

<211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 80

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 81

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 81

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 82

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 82

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 83

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 83

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 84

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 84

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 85
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 85

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

83

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
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
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 His His His His His His	180	185	190
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile	195	200	205

Glu Trp His Glu
210

<210> 88
<211> 641
<212> PRT
<213> Human gammaherpesvirus 4

<400> 88

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
 165 170 175

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
 180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
 210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 325 330 335

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly

87

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys
545 550 555 560

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
565 570 575

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
580 585 590

Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
595 600 605

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
610 615 620

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
625 630 635 640

Glu

<210> 89
<211> 399
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 89

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
275 280 285

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
325 330 335

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
385 390 395

<210> 90

<211> 442

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 90

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 Asp Ile Glu Gly Arg Met
 180 185 190

Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 195 200 205

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 210 215 220

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 225 230 235 240

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 245 250 255

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 260 265 270

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 275 280 285

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 290 295 300

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 305 310 315 320

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 325 330 335

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 340 345 350

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 355 360 365

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385 390 395 400

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
405 410 415

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
420 425 430

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
435 440

<210> 91
<211> 347
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 91

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Lys Asp Asn Thr Val
20 25 30

Pro Leu Lys Leu Ile Ala Leu Leu Ala Asn Gly Glu Phe His Ser Gly
35 40 45

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

His Ile Gln Thr Leu Arg Asp Trp Gly Val Asp Val Phe Thr Val Pro
65 70 75 80

Gly Lys Gly Tyr Ser Leu Pro Glu Pro Ile Gln Leu Leu Asn Ala Lys
85 90 95

Gln Ile Leu Gly Gln Leu Asp Gly Gly Ser Val Ala Val Leu Pro Val
 100 105 110

Ile Asp Ser Thr Asn Gln Tyr Leu Leu Asp Arg Ile Gly Glu Leu Lys
 115 120 125

Ser Gly Asp Ala Cys Ile Ala Glu Tyr Gln Gln Ala Gly Arg Gly Arg
 130 135 140

Arg Gly Arg Lys Trp Phe Ser Pro Phe Gly Ala Asn Leu Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

Met Phe Trp Arg Leu Glu Gln Gly Pro Ala Ala Ala Ile Gly Leu Ser
 165 170 175

Leu Val Ile Gly Ile Val Met Ala Glu Val Leu Arg Lys Leu Gly Ala
 180 185 190

Asp Lys Val Arg Val Lys Trp Pro Asn Asp Leu Tyr Leu Gln Asp Arg
 195 200 205

Lys Leu Ala Gly Ile Leu Val Glu Leu Thr Gly Lys Thr Gly Asp Ala
 210 215 220

Ala Gln Ile Val Ile Gly Ala Gly Ile Asn Met Ala Met Arg Arg Val
 225 230 235 240

Glu Glu Ser Val Val Asn Gln Gly Trp Ile Thr Leu Gln Glu Ala Gly
 245 250 255

Ile Asn Leu Asp Arg Asn Thr Leu Ala Ala Met Leu Ile Arg Glu Leu
 260 265 270

Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Glu Gly Leu Ala Pro Tyr Leu
 275 280 285

Ser Arg Trp Glu Lys Leu Asp Asn Phe Ile Asn Arg Pro Val Lys Leu
290 295 300

Ile Ile Gly Asp Lys Glu Ile Phe Gly Ile Ser Arg Gly Ile Asp Lys
305 310 315 320

Gln Gly Ala Leu Leu Leu Glu Gln Asp Gly Ile Ile Lys Pro Trp Met
325 330 335

Gly Gly Glu Ile Ser Leu Arg Ser Ala Glu Lys
340 345

<210> 92
<211> 442
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 92

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 Leu Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser 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 Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly
85 90 95

95

Ala Glu 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 Ala Thr Pro Pro Ala
 165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met
 180 185 190

Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 195 200 205

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 210 215 220

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 225 230 235 240

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 245 250 255

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 260 265 270

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 275 280 285

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
290 295 300

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
305 310 315 320

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
325 330 335

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
340 345 350

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
355 360 365

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385 390 395 400

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
405 410 415

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
420 425 430

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
435 440

<210> 93

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 93

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 94

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 94

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Leu Lys Asn Phe Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 95
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 95

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Met Lys Asn Lys Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 96

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 96

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Thr Tyr Ala Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Leu Lys Asn Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 106

370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 97
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <400> 97
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Thr Lys Asn Ser Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
108

109

<210> 98
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 98

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Arg Tyr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Lys Lys Asn Tyr His Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 110

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 99
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 99

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 112

35					40					45					
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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	Phe	Gly	Ile	Lys	Asn	His	Met	Asn	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 100
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 100

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Thr Tyr Ala Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Lys Lys Asn Met Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

115

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 101
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 101

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Leu Lys Asn Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 102

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 102

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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

120

Ala Arg Tyr Gly His Lys Asn Met His Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 103

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 103

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Leu Lys Asn Glu Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370

375

380

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 104

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 104

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

125

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
126

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

<210> 105
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 105

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Arg Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Gly Lys Asn Ile Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 128

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 106
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 106

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
130

35																40																45															
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Asn	Tyr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val																																
50						55				60																																					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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	Phe	Gly	Lys	Lys	Asn	Asp	Met	Asn	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp																																
		100						105						110																																	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro																																
		115				120						125																																			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr																																
130						135				140																																					
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr																																
145				150						155																																					
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro																																
				165				170						175																																	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr																																
		180						185						190																																	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn																																
		195				200						205																																			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser																																
210						215						220																																			
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu																																
225				230						235				240																																	
																131																															

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 107
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 107

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Val Lys Asn Asn Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

133

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 108

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 108

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Val Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 109
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 109

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 110

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 110

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Leu Lys Asn Glu Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 142

370

375

380

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 111
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 111

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Phe Gly Gly Lys Asn Asn Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
144

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

<210> 112
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 112

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Glu Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 146

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 113
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 113

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
148

35 40 45
 Met Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Ala Tyr Asp
 85 90 95
 Ala Gln Leu 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
 145 150 155 160
 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 Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 114
 <211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 114

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

Thr Val Asn Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Tyr Arg Tyr Asn
 85 90 95

Asn Leu Leu Ala 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
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 150

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 Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 115
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 115

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Glu Ser Val Ala 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
 145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 116
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 116

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Lys Asn Val Leu 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
 145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 117
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 117

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Asp Gln Val Ala 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
 145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 118

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 118

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

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

155

Thr Ile Val Met 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 119

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 119

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
156

157

<210> 120
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 120

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ser Ile Leu Leu 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
 158

159

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Tyr Arg Tyr Asp
85 90 95

Gln Asn Val Ala 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 122

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 122

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Tyr Tyr Val Leu 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
 145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 123

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 123

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Gly Val Gly 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 124
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 124

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

163

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Ser Ser Asp
85 90 95

Thr His Val Gly 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 125
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 125

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
164

1		5		10		15											
Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Phe	Tyr		
			20				25						30				
Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu		
		35					40					45					
Met	Ile	Tyr	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Leu		
65					70					75					80		
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Ser	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Thr		
				85					90					95			
Glu	Ser	Val	Leu	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		
145					150					155					160		
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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 126

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 126

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Glu Tyr Ile
85 90 95

Glu Ser Val Leu 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
166

130

135

140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 127

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 127

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

167

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

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

Lys Asn Val Leu 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 128

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 128

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Asp
85 90 95

His Gln Val Ser 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 129
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 129

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Tyr Thr Tyr Asn
 85 90 95

Ala Leu Leu Ala 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

170

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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 130

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 130

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

171

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Glu Tyr Ile
85 90 95

Glu Ser Val Leu 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 131

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 131

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

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

Gln Gln Leu Met 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
145 150 155 160

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

173

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 132

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 132

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

174

115

120

<210> 133
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 133

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
 85 90 95

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

<210> 134
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

175

<400> 134

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Glu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

176

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro
450

<210> 135
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 135

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser 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
145 150 155 160

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 Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 136

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 136

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Glu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 137

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 137

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
180

35

40

45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
 85 90 95

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

<210> 138

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 138

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
182

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 139

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 139

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
 50 55 60

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

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

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 140

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 140

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 141

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 142

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 142

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 143
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 143

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30

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

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

186

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

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

<210> 144
<211> 324
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 144

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
100 105 110

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

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
 195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
 210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
 225 230 235 240

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

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
 275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 188

305

310

315

320

Ser Pro Gly Lys

<210> 145

<211> 324

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 145

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
100 105 110

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

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

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

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

190

<210> 146
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 146

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Glu Pro Asn
 100 105 110

Glu Val Glu Asp Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
 115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asp Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

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

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 147

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 147

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 148
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 148

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro
35 40 45

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu
65 70 75 80

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val
85 90 95

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 149

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 149

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 150
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 150

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 151
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 151

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 152
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 152

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 153
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 153

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

201

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 154

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 154

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

203

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 155

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 155

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 156

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 156

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
206

207

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 157

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 157

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
208

20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 209

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 158

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 158

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
210

35

40

45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 159

<211> 325

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 159

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
212

275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu
 325
 <210> 160
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo
 <400> 160
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 65 70 75 80
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 85 90 95

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 100 105 110

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 115 120 125

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 130 135 140

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 145 150 155 160

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 165 170 175

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 180 185 190

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 210 215 220

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 225 230 235 240

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 245 250 255

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 260 265 270

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 275 280 285

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 214

290

295

300

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 305 310 315

<210> 161

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 161

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

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

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

Gly Met Val His Pro Ile Glu Gly Trp Ala Val Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Pro Val Phe Cys Cys Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

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

215

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
216

325

330

335

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro
 450

<210> 162
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 162

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Pro Val Asp Tyr Val Pro His Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 218

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

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

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

Leu Ser Pro
450

<210> 163
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 163

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

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

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

Gly Val Ile Val Pro Ile Asn Gly Ala Ala Gln Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Pro Val Trp Arg Thr Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
220

100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270
Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro
450

<210> 164

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 164

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

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

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

Gly Phe Ile Asn Pro Ile Tyr Gly Ala Ala Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Glu Pro Val Ala Ser Leu Pro His Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

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

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

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

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

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

223

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro
450

<210> 165
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 165

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

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

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

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

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

225

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

Ala Arg Asp Asn Pro Val Thr Ser Trp Pro His Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro
 450

<210> 166
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 166

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Pro Val Asn Ala Ala Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro
 450

<210> 167
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 167

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Pro Val Asn Ala Ala Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
232

435

440

445

Leu Ser Pro
450

<210> 168

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 168

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

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

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

Gly Thr Ile Asn Pro Ile Tyr Gly Val Ala Leu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ala Pro Val Asn Asp Met Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
234

325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro
450

<210> 169
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 169

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Pro
20 25 30

Gly Asp Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Glu Arg Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

236

210

215

<210> 170

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 170

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Pro
 20 25 30

Gly Asp Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Glu Arg Arg Phe Tyr Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 171
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 171

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Ser
20 25 30

Asn Met Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Gln His Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 172

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 172

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Pro
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Lys Asp Phe Pro Arg Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 173

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 173

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Arg Pro
20 25 30

Phe Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Thr Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

His Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

241

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 174

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 174

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp
20 25 30

Arg Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Gly Ser Ile Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
242


```
<210> 175
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 175
```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Trp Asn
 20 25 30

Asp Arg Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Arg Lys Arg Phe Tyr Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Gln Asp Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 176
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

 <400> 176

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Gly
 20 25 30

 Phe Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Arg Lys Arg Phe Tyr Gly Val Pro
 50 55 60

 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

 Phe Ala Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

245

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 177

<211> 258

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 177

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser
 20 25 30

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 35 40 45

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 50 55 60

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
65 70 75 80

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
85 90 95

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
115 120 125

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
130 135 140

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
145 150 155 160

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
165 170 175

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
180 185 190

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
195 200 205

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
210 215 220

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
225 230 235 240

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
245 250 255

Ser Pro

<210> 178

<211> 299

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 178

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
85 90 95

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
100 105 110

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
115 120 125

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
130 135 140

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
145 150 155 160

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
165 170 175

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
180 185 190

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
195 200 205

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
210 215 220

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
225 230 235 240

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
245 250 255

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
260 265 270

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
275 280 285

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
290 295

<210> 179

<211> 377

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 179

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
 1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
 20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His
 35 40 45

Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly
 50 55 60

Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe
 65 70 75 80

Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu
 85 90 95

Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val
 100 105 110

Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr
 115 120 125

Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Asp Ile Glu
 130 135 140

Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 145 150 155 160

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 165 170 175

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 180 185 190

250

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
195 200 205

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
210 215 220

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
245 250 255

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
260 265 270

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
275 280 285

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
290 295 300

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
305 310 315 320

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
325 330 335

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
340 345 350

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
355 360 365

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
370 375

<210> 180
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 180

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
 1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
 20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His
 35 40 45

Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly
 50 55 60

Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro
 65 70 75 80

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 85 90 95

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 100 105 110

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 115 120 125

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 130 135 140

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 145 150 155 160

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 165 170 175

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 180 185 190

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 195 200 205

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 210 215 220

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 225 230 235 240

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 245 250 255

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 260 265 270

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 275 280 285

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 290 295 300

Ser Leu Ser Pro
 305

<210> 181

<211> 336

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 181

Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
 1 5 10 15

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
 20 25 30

Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
 35 40 45

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
 50 55 60

Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
 65 70 75 80

Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
 85 90 95

His Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp
 100 105 110

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 130 135 140

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 165 170 175

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 180 185 190

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
195 200 205

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
210 215 220

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
225 230 235 240

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
245 250 255

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
260 265 270

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
275 280 285

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
290 295 300

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
305 310 315 320

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325 330 335

<210> 182

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<400> 182

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

255

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 183
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 183

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 257

35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu
 165 170 175
 Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 180 185
 <210> 184
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 184
 Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 185
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 185

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45

260

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 186

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 187
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IC17Hdk

<400> 187

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 188
 <211> 107
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IC17VL

<400> 188

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
100 105

<210> 189

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> lam1

<400> 189

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 190

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MRAH

<400> 190

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 191
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MRAL

<400> 191

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

265

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 192
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H0002

<400> 192

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Tyr His Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 193

<211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L1058

<400> 193

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Val Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Ala Gly
 85 90 95

Pro Tyr Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 194
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H0041

<400> 194

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gln Ser Tyr His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 195
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L1088

<400> 195

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 268

35 40 45
 Met Ile Tyr Tyr Val Ser Lys Lys Pro Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Pro Gly
 85 90 95
 Pro Tyr Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

 <210> 196
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> H0052

 <400> 196

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Tyr His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Asp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 197
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L1083

<400> 197

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Tyr Val Asp Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Pro Gly
 85 90 95

Pro Tyr Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 198
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> G4T1

<400> 198

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Arg Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

271

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 199

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> k0

<400> 199

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 200

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg Gly Val Leu
1 5 10 15

Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro Gly Val Glu
20 25 30

Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys Pro Ala Ala
 35 40 45

Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg Leu Leu Leu
 50 55 60

Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Arg Ala
 65 70 75 80

Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val Pro Pro Glu
 85 90 95

Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val
 100 105 110

Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr Lys Ala Val
 115 120 125

Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu
 130 135 140

Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala
 145 150 155 160

Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met Cys Val Ala
 165 170 175

Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe Gln Gly Cys
 180 185 190

Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val Thr Ala Val
 195 200 205

Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp Pro His Ser
 210 215 220

Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Ala
 225 230 235 240

Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp Leu Gln His
 245 250 255

His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His Val Val Gln
 260 265 270

Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser Glu Trp Ser
 275 280 285

Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro Ala
 290 295 300

Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr Asn Lys Asp
 305 310 315 320

Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr Ser Leu Pro
 325 330 335

Val Gln

<210> 201
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mPD1F2VH

<400> 201

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Glu Asn Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 202
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mPD1F2VL

<400> 202

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 203

<211> 324

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 203

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Lys
100 105 110

Glu Val Ser Lys Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
 115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
 195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
 210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
 225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
 245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
 275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 278

305

310

315

320

Ser Pro Gly Lys

<210> 204

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H5029

<400> 204

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Arg His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Arg Pro Phe Glu Leu Leu Trp Val Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 205
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L3021

<400> 205

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Pro Ser Gly Ala Trp
 20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Thr Ser Ser Ala
 85 90 95

Trp Asp Pro Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 206
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H5041

<400> 206

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 280

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Lys His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Tyr Gly Arg Pro Trp Glu Leu Leu Trp Val Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 207
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> L3023
 <400> 207
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Pro Ser Gly Ala Tyr
 20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Thr Asn Ser Ala
 85 90 95

Trp Asp Pro Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 208
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mFa31

<400> 208

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 209

<211> 402

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mPD1-G1CH2

<400> 209

Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg
 20 25 30

Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn
 35 40 45

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu
 50 55 60

Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala
 65 70 75 80

Phe Ser Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile
 85 90 95

Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr
 100 105 110

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His
 115 120 125

Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr
 130 135 140

Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Arg Phe Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser
 165 170 175

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 180 185 190

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 195 200 205

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 210 215 220

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 225 230 235 240

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 245 250 255

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 260 265 270

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 275 280 285

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 290 295 300

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 305 310 315 320

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 325 330 335

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 340 345 350

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 355 360 365

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 370 375 380

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 385 390 395 400

Ser Pro

<210> 210
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mPDL1-G1dCH2His

<400> 210

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
 20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
 35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
 50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
 85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
 100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
 115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
 130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
 145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
 165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
 180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
 195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Ile Glu Gly
 210 215 220

Arg Met Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 288

420

425

430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His
 450 455 460

<210> 211
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mk0

<400> 211

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 212
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ml0

<400> 212

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val
 35 40 45

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg
 65 70 75 80

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
 100 105

<210> 213
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hIL6R

<400> 213

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 290

1	5	10	15
Gly	Ala	Ala	Leu
			20
Ala	Pro	Arg	Arg
			25
Cys	Pro	Ala	Gln
			30
Glu	Val	Ala	Arg
Gly	Val	Leu	Thr
			35
Ser	Leu	Pro	Gly
			40
Asp	Ser	Val	Thr
			45
Leu	Thr	Cys	Pro
Gly	Val	Glu	Pro
			50
Glu	Asp	Asn	Ala
			55
Thr	Val	His	Trp
			60
Val	Leu	Arg	Lys
Pro	Ala	Ala	Gly
			65
Ser	His	Pro	Ser
			70
Arg	Trp	Ala	Gly
			75
Met	Gly	Arg	Arg
			80
Leu	Leu	Leu	Arg
			85
Ser	Val	Gln	Leu
			90
His	Asp	Ser	Gly
			95
Asn	Tyr	Ser	Cys
Tyr	Arg	Ala	Gly
			100
Arg	Pro	Ala	Gly
			105
Thr	Val	His	Leu
			110
Leu	Val	Asp	Val
Pro	Pro	Glu	Glu
			115
Pro	Gln	Leu	Ser
			120
Cys	Phe	Arg	Lys
			125
Ser	Pro	Leu	Ser
Asn	Val	Val	Cys
			130
Glu	Trp	Gly	Pro
			135
Arg	Ser	Thr	Pro
			140
Ser	Leu	Thr	Thr
Lys	Ala	Val	Leu
			145
Leu	Val	Arg	Lys
			150
Phe	Gln	Asn	Ser
			155
Pro	Ala	Glu	Asp
			160
Phe	Gln	Glu	Pro
			165
Cys	Gln	Tyr	Ser
			170
Gln	Lys	Phe	Ser
			175
Cys			
Gln	Leu	Ala	Val
			180
Pro	Glu	Gly	Asp
			185
Ser	Ser	Phe	Tyr
			190
Ile	Val	Ser	Met
Cys	Val	Ala	Ser
			195
Ser	Val	Gly	Ser
			200
Lys	Phe	Ser	Lys
			205
Thr	Gln	Thr	Phe

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
 355 360 365

Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
 370 375 380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly
 385 390 395 400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu
 405 410 415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val
 420 425 430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro
 435 440 445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr
 450 455 460

Phe Phe Pro Arg
 465

<210> 214
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 214

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp
 20 25 30

Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met
 50 55 60

Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln
 293

	85		90		95	
Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp	100	105	110			
Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu	115	120	125			
His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val	130	135	140			
Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro	145	150	155	160		
Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly	165	170	175			
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys	180	185	190			
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro	195	200	205			
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly	210	215	220			
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro	225	230	235	240		
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly	245	250	255			
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg	260	265	270			
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu	275	280	285			

<210> 215
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> G1m

<400> 215

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 295

145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325
 <210> 216
 <211> 106

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lam1

<400> 216

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 217
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> G1d

<400> 217

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 218
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> k0

<400> 218

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
300

301

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 220
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 220

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 303

305

310

315

320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 221

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

304

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

305

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 222

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

306

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

307

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 223

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> G1T6

<400> 223

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

308

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 224
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> TR01H113

<400> 224

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Val Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Gly Tyr Gly Val Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 225
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> L0011-k0

<400> 225

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Pro Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
 85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

311

180

185

190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215