



(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)



1-0024652

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 37/00; A61K 39/395; (13) B
A61P 35/00

(21) 1-2014-01315

(22) 20/09/2012

(86) PCT/US2012/056429 20/09/2012

(87) WO2013/043933 28/03/2013

(30) 61/538,024 22/09/2011 US

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/08/2014 317A

(73) Amgen Inc. (US)

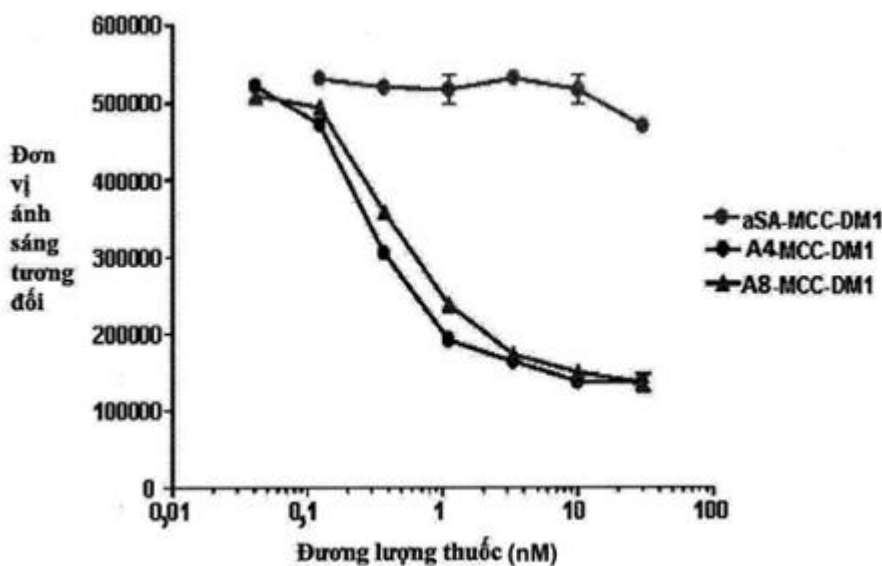
One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799, United States of America

(72) DELANEY, John M. (US); FANSLOW, William Christian, III (US); KING, Chadwick Terence (CA).

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

(54) PROTEIN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CD27L, CHẾ PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ THỂ CỘNG HỢP THUỐC - KHÁNG THỂ CD27L

(57) Sáng chế đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên CD27L, như các kháng thể, các polynucleotit mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CD27L, các chế phẩm chứa protein này, và các phương pháp bào chế thể cộng hợp thuốc- kháng thể CD27L để chẩn đoán và điều trị các bệnh liên quan đến sự biểu hiện CD27L.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên bao gồm các kháng thể có khả năng liên kết với CD27L, cũng như các phương pháp liên quan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD27L (CD70, TNFSF7) là protein màng nguyên typ II (type II integral membrane protein), mà biểu hiện của nó ở các mô bình thường bị giới hạn chặt chẽ bởi tập hợp con của các tế bào T và B hoạt hóa, các tế bào đuôi gai và bởi tập hợp con nhỏ của các tế bào ở biểu mô tuyến ức. Các chức năng sinh học của CD27L, mà bao gồm làm tăng hoặc điều hòa đáp ứng miễn dịch, được điều hòa qua sự liên kết với thụ thể của nó, CD27, mà được biểu hiện chủ yếu ở các tế bào bạch huyết. Các tương tác CD27L/CD27 điều hòa sự tăng sinh và sự biệt hóa tế bào B và sự đồng kích thích/hoạt hóa tế bào T. Việc phá vỡ sự tương tác CD27L/CD27 ở chuột thiếu CD27 không tạo ra bất kỳ kiểu hình nào khi không có thử thách miễn dịch. (Grewal, *Expert Opin. Ther. Targets*. 12, 341-351 (2008)).

Ngoài sự biểu hiện rất giới hạn của nó ở các mô bình thường, CD27L được biểu hiện với các mức tương đối cao ở một số loại phụ khối u lympho tế bào B không phải Hodgkin (B cell non-Hodgkin's lymphoma, B-NHL), ở bệnh bạch cầu lympho bào cấp tiền tế bào B (pre-B cell acute lymphocytic leukemia, ALL) và ở bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính tế bào B (B cell type-chronic lymphocytic leukemia, B-CLL). Sự biểu hiện CD27L bất thường cũng được quan sát thấy ở bệnh ung thư biểu mô tế bào thận (renal cell carcinoma, RCC) nhưng không có ở thận bình thường hoặc các mô bình thường khác. Như vậy, CD27L gần như thể hiện các thuộc tính phù hợp với các thuộc tính của “kháng nguyên đặc hiệu khối u” (Grewal, *Expert Opin. Ther. Targets*. 12, 341-351 (2008)).

Hàng năm, ở Mỹ, trong số khoảng 49.000 bệnh nhân sẽ mắc RCC, có hơn 40.000 bệnh nhân một chút trong số những bệnh nhân này sẽ bị chẩn đoán mắc ccRCC (American Cancer Society: Cancer Facts and Figures final (2008)). Mặc dù một số liệu pháp mới hơn đã được phê chuẩn cho RCC trong hơn 4 năm qua, tỷ lệ sống sót 5 năm ở các bệnh nhân bị RCC di căn vẫn còn rất thấp ở mức 10-20% (National Cancer Institute. SEER cancer statistics fact sheet: cancer of the kidney and renal pelvis -- truy cập năm 2008) và vẫn còn nhu cầu y tế chưa được đáp ứng đáng kể. Số bệnh nhân được chẩn đoán mới là mắc ccRCC (U.S.) được dự đoán hàng năm mà dự kiến biểu hiện CD27L là khoảng 36.000 ca. Theo ước tính, hiện tại có 64.000 bệnh nhân ccRCC đang mắc bệnh.

Trong số các khối u ác tính của tế bào B được báo cáo biểu hiện CD27L bất thường, các tập hợp con B-NHL của u lympho tế bào B tế bào lớn lan tỏa (diffuse large cell B-cell lymphoma, DLBCL) và u lympho nang (follicular lymphoma, FL) thể hiện tỷ lệ biểu hiện mắc bệnh cao nhất nằm trong khoảng từ 33% đối với FL đến 71% đối với DLBCL như được đánh giá bởi IHC ở các mẫu cắt được đông lạnh bằng cách sử dụng kháng thể có hiệu lực (Lens et al., *Brit. J. Hematol.* 106, 491-503 (1999)). 50-89% số khối u B-CLL cũng biểu hiện CD27L như được đánh giá bởi IHC ở các mẫu cắt khối u được đông lạnh hoặc bằng cách đếm tế bào theo dòng ở các tế bào khối u tuần hoàn (Ranheim et al., *Blood* 85, 3556-3565 (1995); Trentin et al., *cancer Res.* 57, 4940-4947 (1997)).

Trong số 127.000 bệnh nhân ở Mỹ hiện nay bị B-NHL hoạt động, khoảng 50% trong số các bệnh nhân này thể hiện DLBCL typ phụ (mức độ trung bình) (Morton et al., *Blood* 107, 265-276 (2002)). Mặc dù chuẩn theo liệu pháp chăm sóc cho các bệnh nhân DLBCL là Rituxan cộng với xyclophosphamit, adriamycin, vincristin, prednison (Rituxan plus cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone, CHOP), gần như 50% số bệnh nhân bị tái phát. Do vậy cũng vẫn còn nhu cầu y tế chưa được đáp ứng cho bệnh này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên kháng CD27L, ví dụ, các kháng thể và các đoạn chức năng của nó. Các protein liên kết kháng nguyên kháng CD27L là đặc

biệt hữu dụng trong các phương pháp điều trị các bệnh và các rối loạn liên quan đến hiện tượng tăng sinh tế bào bất thường, ví dụ, bệnh ung thư, và/hoặc chứng viêm.

Theo khía cạnh thứ nhất, protein liên kết kháng nguyên CD27L bao gồm a) miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, hoặc SEQ ID NO:70; b) miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, hoặc SEQ ID NO:24; hoặc c) miền biến đổi chuỗi nhẹ của a) và miền biến đổi chuỗi nặng của b).

Các protein liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo khía cạnh thứ nhất bao gồm các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:64 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:18; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:65 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:19; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:66 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:20; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:67 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:21; các

protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:68 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:22; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:69 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:23; và các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:70 và miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc giống hệt với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:24.

Theo khía cạnh thứ hai, protein liên kết kháng nguyên CD27L bao gồm a) miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, hoặc SEQ ID NO:70; b) miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, hoặc SEQ ID NO:24; hoặc c) miền biến đổi chuỗi nhẹ của a) và miền biến đổi chuỗi nặng của b).

Các protein liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo khía cạnh thứ hai bao gồm các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:64 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:18; các protein chứa

miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:65 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:19; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:66 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:20; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:67 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:21; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:68 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:22; các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:69 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:23; và các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:70 và miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười hoặc không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:24.

Theo khía cạnh thứ ba, protein liên kết kháng nguyên CD27L chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm a) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:71; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:79; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3

[illegible]

hoặc thể axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:94; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa i) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:25; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:33; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:41; j) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:26; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:34; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:42; k) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:27; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:35; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:43; l) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:28; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:36; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:44; m) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:29; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:37; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:45; n) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:30; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:38; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:46; o) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:31; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự

HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:39; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:47; hoặc p) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:32; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:40; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:48.

Các protein liên kết kháng nguyên CD27L được ưu tiên theo khía cạnh thứ ba bao gồm các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của a) và miền biến đổi chuỗi nặng của i); các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của b) và miền biến đổi chuỗi nặng của j); các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của c) và miền biến đổi chuỗi nặng của k); các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của d) và miền biến đổi chuỗi nặng của l); các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của e) và miền biến đổi chuỗi nặng của m); các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của f) và miền biến đổi chuỗi nặng của n); các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của g) và miền biến đổi chuỗi nặng của o); và các protein chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của h) và miền biến đổi chuỗi nặng của p).

Theo khía cạnh thứ tư của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, hoặc thứ ba liên kết với CD27L ở người với ái lực nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-11} M.

Theo khía cạnh thứ năm của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, hoặc thứ tư ức chế liên kết của CD27L với CD27.

Theo khía cạnh thứ sáu của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, hoặc thứ năm là kháng thể, như kháng thể của người. Các kháng thể được ưu tiên bao gồm các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:56 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:10; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:57 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:11; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong

SEQ ID:58 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:12; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:59 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:13; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:60 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:14; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:61 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:15; và các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:62 và chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:16.

Theo khía cạnh thứ bảy, protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, hoặc thứ sáu được cộng hợp với thuốc hoặc chất hóa trị liệu. Theo các phương án ưu tiên, thuốc hoặc chất hóa trị liệu được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên, ví dụ kháng thể, bằng cách sử dụng cầu nối. Các cầu nối được ưu tiên bao gồm các cầu nối không phân cắt được như MCC. Chất hóa trị liệu được ưu tiên là DM1. Như vậy, theo các phương án được đặc biệt ưu tiên, khía cạnh thứ bảy đề xuất protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, hoặc thứ sáu được cộng hợp với DM1 bằng cầu nối MCC được gắn với một hoặc nhiều gốc lysin.

Quá trình cộng hợp DM1 với protein liên kết kháng nguyên CD27L, ví dụ kháng thể, sẽ tạo ra chế phẩm chứa tập hợp của các kháng thể được cộng hợp với DM1, có phạm vi phân tử DM1 trên một kháng thể. Số lượng trung bình cho chế phẩm có thể được đánh giá. Theo các phương án ưu tiên, số lượng phân tử DM1 trung bình trên một protein liên kết kháng nguyên CD27L, ví dụ kháng thể, là nằm trong khoảng từ 1 đến 10, từ 3 đến 7, hoặc từ 4 đến 6. Theo các phương án ưu tiên, chế phẩm chứa các protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, hoặc thứ bảy theo sáng chế này có số lượng phân tử DM1 trung bình trên một protein liên kết kháng nguyên CD27L là khoảng 4,0, khoảng 4,1, khoảng 4,2, khoảng 4,3, khoảng 4,4, khoảng 4,5, khoảng 4,6, khoảng 4,7, khoảng 4,8, khoảng 4,9, khoảng 5,0, khoảng 5,1, khoảng 5,2, khoảng 5,3, khoảng 5,4, khoảng 5,5, khoảng 5,6, khoảng 5,7, khoảng 5,8, khoảng 5,9, hoặc

khoảng 6,0. Chế phẩm này có thể chứa lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết kháng nguyên CD27L và có thể được làm đông khô.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất các axit nucleic phân lập mã hóa một hoặc nhiều thành phần polypeptit của protein liên kết kháng nguyên CD27L, ví dụ, chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Theo các phương án ưu tiên axit nucleic mã hóa polypeptit chứa:

a) miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, hoặc SEQ ID NO:70;

b) miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, hoặc SEQ ID NO:24;

c) miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, hoặc SEQ ID NO:70;

d) miền biến đổi chuỗi nặng có không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, hoặc SEQ ID NO:24;

e) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

i) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:71; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:79; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:87;

ii) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:72; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:80; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:88;

iii) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:73; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:81; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:89;

iv) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:74; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:82; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:90;

v) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:75; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:83; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:91;

vi) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:76; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:84; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:92;

vii) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:77; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:85; và LCDR3

có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:93; hoặc

viii) LCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:78; LCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:86; và LCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:94; hoặc

f) miền biến đổi chuỗi nặng chứa:

i) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:25; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:33; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:41;

ii) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:26; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:34; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:42;

iii) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:27; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:35; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:43;

iv) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:28; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:36; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:44;

v) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:29; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:37; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:45;

vi) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:30; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:38; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:46;

vii) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:31; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:39; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:47; hoặc

viii) HCDR1 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:32; HCDR2 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:40; và HCDR3 có không quá ba sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:48.

Theo các phương án cụ thể của khía cạnh thứ tám, polypeptit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể và có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc 100% với trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, hoặc SEQ ID NO:55. Theo các phương án khác của khía cạnh thứ tám, polypeptit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể và có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc 100% với trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, hoặc SEQ ID NO:9.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện chứa một hoặc nhiều axit nucleic được phân lập theo khía cạnh thứ tám. Theo các phương án cụ thể, vectơ biểu hiện này mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, chuỗi nặng của kháng thể, hoặc cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất tế bào chủ tái tổ hợp chứa một hoặc nhiều axit nucleic được phân lập theo khía cạnh thứ tám được liên kết hoạt động với trình tự khởi động, bao gồm các tế bào chủ tái tổ hợp chứa một hoặc nhiều vectơ biểu hiện theo khía cạnh thứ chín của sáng chế. Theo các phương án ưu tiên, tế bào chủ tái tổ hợp này tiết kháng thể mà liên kết với CD27L. Các tế bào chủ được ưu tiên là các tế bào chủ động vật có vú, bao gồm các dòng tế bào CHO.

Theo khía cạnh mười một, sáng chế đề xuất các phương pháp bào chế thể cộng hợp thuốc - kháng thể CD27L theo khía cạnh thứ bảy bằng cách cộng hợp cầu nối và thuốc, ví dụ, chất hóa trị liệu, với protein bất kỳ trong số các protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, hoặc khía cạnh thứ sáu. Cầu nối và thuốc có thể đầu tiên được liên kết và sau đó được liên hợp với protein liên kết kháng nguyên CD27L hoặc cầu nối có thể đầu tiên được liên hợp với protein liên kết kháng nguyên CD27L sau đó được kết nối với thuốc. Theo các phương án ưu tiên, cầu nối này là MCC và thuốc là DM1. Theo các phương án đặc biệt ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên CD27L này là kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:63 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:17 (ví dụ, Ab1), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:64 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:18 (ví dụ, Ab2), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:65 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:19 (ví dụ, Ab3), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:66 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:20 (ví dụ, Ab4), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:67 và trình tự axit amin

của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:21 (ví dụ, Ab5), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:68 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:22 (ví dụ, Ab6), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:69 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:23 (ví dụ, Ab7), hoặc kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:70 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:24 (ví dụ, Ab8) được cộng hợp với DM1 bằng MCC bởi phản ứng hóa học của một hoặc nhiều gốc lysin trong kháng thể với MCC hoặc MCC-DM1.

Theo khía cạnh mười hai, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước cho bệnh nhân dùng lượng có hiệu quả điều trị của chế phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết kháng nguyên CD27L theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, hoặc thứ sáu. Theo các phương án ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên CD27L này là kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:63 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:17 (ví dụ, Ab1), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:64 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:18 (ví dụ, Ab2), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:65 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:19 (ví dụ, Ab3), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:66 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:20 (ví dụ, Ab4), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:67 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:21 (ví dụ, Ab5), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:68 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:22 (ví dụ, Ab6), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến

đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:69 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:23 (ví dụ, Ab7), hoặc kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:70 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:24 (ví dụ, Ab8). Theo các phương án đặc biệt ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên CD27L này được liên hợp với chất hóa trị liệu (ví dụ, DM1) bởi cầu nối (MCC). Theo các phương án ưu tiên khác của khía cạnh mười hai, kháng thể bao gồm chức năng yếu tố tác động được tăng cường.

Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L được dùng cho bệnh nhân bị mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào thận (renal cell carcinomas, RCC), RCC tế bào sáng, ung thư đầu và cổ, u nguyên bào đệm, ung thư vú, u não, ung thư biểu mô vòm mũi họng, u lympho không Hodgkin (non-Hodgkin's lymphoma, NHL), bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (acute lymphocytic leukemia, ALL), bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính (chronic lymphocytic leukemia, CLL), u lympho Burkitt, các u lympho tế bào lớn thoái biến (anaplastic large-cell lymphomas, ALCL), đa u tủy, các u lympho tế bào T ở da, các u lympho tế bào hạch nhỏ có khía (nodular small cleaved-cell lymphomas), các u lympho bạch huyết bào (lymphocytic lymphomas), các u lympho tế bào T ngoại biên, các u lympho Lennert, u lympho nguyên bào miễn dịch (immunoblastic lymphoma), bệnh bạch cầu/các u lympho tế bào T (T-cell leukemia/lymphomas, ATLL), bệnh bạch cầu tế bào T người lớn (adult T-cell leukemia, T-ALL), ung thư u lympho tuyến nang ở nguyên bào ruột/tế bào trung tâm (entroblastic/centrocytic (cb/cc) follicular lymphomas cancers), các u lympho lan tỏa tế bào lớn của dòng tế bào B (diffuse large cell lymphomas of B lineage), u lympho tế bào T tương tự hạch lympho phù mạch (angioimmunoblastic lymphadenopathy, AILD), u lympho tại khoang cơ thể liên quan đến HIV, ung thư biểu mô phôi, ung thư biểu mô chưa biệt hóa ở mũi-họng, bệnh Castleman, saccôm Kaposi, đa u tủy, macroglobulin huyết Waldenstrom hoặc u lympho tế bào B khác.

Theo các phương án cụ thể, mẫu từ bệnh nhân được xét nghiệm về biểu hiện CD27L trước khi dùng protein liên kết kháng nguyên CD27L. Biểu hiện CD27L có thể được xác

định bằng xét nghiệm sự có mặt của ARN mã hóa CD27L hoặc sự có mặt của protein CD27L trong mẫu. Mẫu này có thể là mẫu máu hoặc mẫu sinh thiết.

Theo khía cạnh mười ba, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị rối loạn tự miễn hoặc rối loạn do viêm, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết kháng nguyên CD27L của một protein bất kỳ theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, hoặc thứ sáu cho bệnh nhân cần điều trị. Theo các phương án ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên CD27L là kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:63 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:17 (ví dụ, Ab1), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:64 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:18 (ví dụ, Ab2), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:65 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:19 (ví dụ, Ab3), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:66 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:20 (ví dụ, Ab4), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:67 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:21 (ví dụ, Ab5), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:68 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:22 (ví dụ, Ab6), kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:69 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:23 (ví dụ, Ab7), hoặc kháng thể chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ như được trình bày trong SEQ ID NO:70 và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng như được trình bày trong SEQ ID NO:24 (ví dụ, Ab8). Theo các phương án ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên CD27L ức chế liên kết của CD27 với CD27L. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, tự miễn hoặc rối loạn do viêm là lupus ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus, SLE), bệnh đái đường phụ thuộc insulin (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM), bệnh

viêm ruột (inflammatory bowel disease, IBD), đa xơ cứng (multiple sclerosis, MS), bệnh vẩy nến, viêm tuyến giáp tự miễn, thấp khớp (rheumatoid arthritis, RA), hoặc viêm thận tiểu cầu. Theo các phương án khác, điều trị ức chế hoặc phòng ngừa bệnh lý thải bỏ mảnh ghép hoặc bệnh lý mảnh ghép chống lại vật chủ ở bệnh nhân.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1. Tóm tắt các đặc tính chức năng và vật lý của các phương án làm ví dụ về protein liên kết kháng nguyên CD27L.

FIG. 2. Đo mức và tốc độ nội bào hóa của Ab4 (A4) và Ab8 (A8) và các thể cộng hợp tương ứng của chúng ở các tế bào 786-0 theo thời gian (A).

FIG. 3. Các tế bào 786-0 được nuôi cấy 4 ngày khi có MCC-DM1 kháng streptavidin, Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 với các nồng độ tăng. Ảnh hưởng đến sự phát triển tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng chất phản ứng CELL-TITER-GLO đánh giá số tế bào bằng cách sử dụng kết quả đọc phát quang.

FIG. 4. Đáp ứng liều của Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 ở mô hình ghép ngoại lai 786-0. Liều trong tĩnh mạch vào ngày 24 được biểu thị bằng mũi tên tại các liều biểu thị.

FIG. 5. Đáp ứng liều của Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 ở mô hình ghép ngoại lai Caki-1. Phác đồ liều dùng trong tĩnh mạch được biểu thị bằng các mũi tên.

FIG. 6. Đáp ứng liều của Ab4-MCC-DM1 ở mô hình ghép ngoại lai Raji. Phác đồ liều dùng trong tĩnh mạch được biểu thị bằng các mũi tên.

FIG. 7. Đáp ứng liều thay đổi của Ab4-MCC-DM1 ở mô hình ghép ngoại lai 786-0.

FIG. 8. Thử nghiệm Gây độc Tế bào Phụ thuộc Kháng thể Ab4-MCC-DM1 (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity, ADCC) kháng các tế bào khối u Raji.

FIG. 9. Thử nghiệm Thực bào Tế bào Phụ thuộc Kháng thể Ab4-MCC-DM1 (Antibody Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP) kháng cả các tế bào khối u Raji và 786-0.

FIG. 10. So sánh biểu hiện CD27L đối với các mẫu khối u đông lạnh sơ cấp mà đạt điểm “đương” theo IHC được che. Các kết quả biểu thị là biểu hiện toàn bộ protein CD27L cao nhất ở các mẫu bệnh nhân bị ccRCC, theo sau là DLBCL (U Lympho Tế bào B Lớn Lan tỏa, Diffuse Large B-Cell Lymphoma); các mẫu B-CLL và FL.

FIG. 11. Các kết quả về mRNA của CD27L và Phân tích Biểu hiện Protein. Các kết quả biểu thị là biểu hiện CD27L cao phổ biến ở các tế bào RCC, B-NHL và CLL.

FIG. 12. Trình bày cấu trúc của các ADC Ab-MCC-DM1 được mô tả trong Ví dụ 2 ở đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phần tiêu đề được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích sắp xếp và không được hiểu là làm giới hạn đối tượng được mô tả. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong phần mô tả này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng đối với ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy mô và biến nạp, tinh chế protein, v.v.. Các phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc như được thực hiện thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả ở đây. Nói chung, các quy trình và các kỹ thuật sau có thể được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung khác nhau và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn được trích dẫn và được thảo luận trong toàn bộ bản mô tả. *Tham khảo, ví dụ*, Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ. Trừ khi có định nghĩa cụ thể, danh pháp được sử dụng liên quan, và các quy trình và các kỹ thuật phòng thí nghiệm, hóa phân tích, hóa hữu cơ, và y học và hóa dược được mô tả ở đây là đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học, các phân tích hóa học, bào chế dược, điều chế, và phân phối và điều trị cho các bệnh nhân.

CD27L

Các protein liên kết kháng nguyên liên kết với CD27L, cũng được biết là CD70 và TNFSF7. CD27L được mô tả đầu tiên trong Patent Mỹ Số 5.573.924. Trình tự axit amin CD27L người làm ví dụ được đề xuất ở đây là SEQ ID NO:1, tương ứng với Trình tự NCBI Tham chiếu NP_001423.1 (GI:4507605). Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên phong bế tương tác của CD27L với thụ thể CD27 của nó. Trình tự axit amin CD27 làm ví dụ được đề xuất là SEQ ID NO:2, tương ứng với Swiss-Prot: P26842.2 (GI:269849546). Trình tự axit amin CD27 trưởng thành tương ứng với các axit amin 20-260 của SEQ ID NO:2.

Các protein liên kết kháng nguyên CD27L

Sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với CD27L. Các phương án về các protein liên kết kháng nguyên bao gồm các peptit và/hoặc các polypeptit liên kết đặc hiệu với CD27L. Các peptit hoặc các polypeptit như vậy có thể bao gồm tùy ý một hoặc nhiều biến đổi sau dịch mã. Các phương án về các protein liên kết kháng nguyên bao gồm các kháng thể và các đoạn của nó, như được định nghĩa riêng ở đây, liên kết đặc hiệu với CD27L. Các kháng thể này và các đoạn của nó bao gồm các kháng thể liên kết đặc hiệu với CD27L ở người, bao gồm các kháng thể và các đoạn của nó ức chế CD27L khỏi liên kết và/hoặc hoạt hóa CD27.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết đặc hiệu với CD27L. “Các liên kết đặc hiệu” như được sử dụng ở đây nghĩa là protein liên kết kháng nguyên liên kết với CD27L một cách ưu tiên hơn các protein khác. Theo một số phương án “các liên kết đặc hiệu” nghĩa là protein liên kết kháng nguyên CD27L có ái lực đối với CD27L cao hơn so với các protein khác. Các protein liên kết kháng nguyên CD27L mà liên kết đặc hiệu với CD27L có thể có ái lực liên kết với CD27L ở người là nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-8} M, nhỏ

hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-12} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-12} M. Các phương pháp đo ái lực liên kết của protein liên kết kháng nguyên là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ 1 đưa ra phương pháp làm ví dụ.

Cần hiểu rằng khi liên quan đến các phương án khác nhau tạo ra các kháng thể liên kết CD27L ở đây, nó cũng bao hàm các đoạn liên kết với CD27L của nó. Đoạn liên kết với CD27L bao gồm đoạn bất kỳ của các đoạn hoặc các miền kháng thể được mô tả ở đây mà giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với CD27L. Đoạn liên kết với CD27L có thể nằm trong khung bất kỳ trong số các khung được mô tả ở đây.

Theo các phương án trị liệu cụ thể, protein liên kết kháng nguyên CD27L ức chế liên kết của CD27L với CD27 và/hoặc ức chế một hoặc nhiều hoạt tính sinh học liên quan đến liên kết của CD27L với CD27, ví dụ, sự truyền tín hiệu qua trung gian CD27. Các protein liên kết kháng nguyên như vậy được nói đến là protein “trung hòa.” Theo các phương án cụ thể, protein trung hòa liên kết kháng nguyên CD27L liên kết đặc hiệu với CD27L và ức chế liên kết của CD27L với CD27 bằng phần trăm bất kỳ nằm trong khoảng 10% đến 100%, như bằng ít nhất khoảng 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,

81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% hoặc nhiều hơn. Ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên CD27L có thể được thử nghiệm về khả năng trung hòa bằng cách xác định khả năng của protein liên kết kháng nguyên để phong bế liên kết của CD27-Fc với các tế bào MP-1 (Slack et al, Int. Immunol. (1995) 7(7): 1087-1092)).

Các phương án về các protein liên kết kháng nguyên bao gồm cấu trúc khung, như được định nghĩa riêng ở đây, có một hoặc nhiều vùng quyết định bổ sung (complementarity determining regions, CDRs). Các phương án còn bao gồm các protein liên kết kháng nguyên chứa cấu trúc khung có một hoặc nhiều miền biến đổi của kháng thể, hoặc miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ. Các phương án bao gồm các kháng thể mà bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ của Ab1 (Light Chain Variable, LCv), Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, và Ab8 LCv (SEQ ID NO:63-70, lần lượt) và/hoặc miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của Ab1 (Heavy Chain Variable, HCv), Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, và Ab8 HCv (SEQ ID NO:17-24, lần lượt), và các đoạn, các dẫn xuất, các protein đột biến, và các biến thể của chúng.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab1 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:56.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab2 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:57.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab4 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:58.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab5 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:59.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab6 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:60.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab7 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:61.

Chuỗi nhẹ làm ví dụ chứa Ab8 LCv là chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:62.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab1 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:10.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab2 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:11.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab4 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:12.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab5 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:13.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab6 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:14.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab7 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:15.

Chuỗi nặng làm ví dụ chứa Ab8 HCv là chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:16.

Các ví dụ bổ sung về các khung được hình dung bao gồm: fibronectin, neocarzinostatin CBM4-2, các lipocalin, thụ thể tế bào T, miền protein -A (protein Z), Im9, các protein TPR, các miền ngón tay kẽm, pVIII, polypeptit tuyến tụy ở chim, GCN4, miền 3 tương đồng Src của miền WW, các miền PDZ, TEM-1 beta-lactamaza, thioredoxin, staphylococcal nucleaza, các miền ngón tay PHD, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotin, LACI-D1, LDTI, MTI-II, các độc tố bọt cạp, peptit defensin-A côn trùng, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, xytochrom b-562, các miền thụ thể Ldl, gama-crystallin, ubiquitin, transferin, và hoặc các miền tương tự lectin typ C. Các khung không phải kháng thể và sử dụng chúng như các thuốc chữa bệnh được đánh giá trong Gebauer and Skerra, *Curr. Opin.*

Chem. Biol., 13:245-255 (2009) và Binz et al., *Nat. Biotech.*, 23(10):1257-1268 (2005), toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa các miền biến đổi sau đây: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:63/SEQ ID NO:17), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:64/SEQ ID NO:18), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:65/SEQ ID NO:19), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:66/SEQ ID NO:20), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:67/SEQ ID NO:21), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:68/SEQ ID NO:22), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:69/SEQ ID NO:23), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:70/SEQ ID NO:24), và các tổ hợp của chúng, cũng như các đoạn, các dẫn xuất, các protein đột biến và các biến thể của chúng.

Các kháng thể làm ví dụ theo sáng chế bao gồm Ab1 (SEQ ID NO:56/SEQ ID NO:10), Ab2 (SEQ ID NO:57/SEQ ID NO:11), Ab4 (SEQ ID NO:58/SEQ ID NO:12), Ab5 (SEQ ID NO:59/SEQ ID NO:13), Ab6 (SEQ ID NO:60/SEQ ID NO:14), Ab7 (SEQ ID NO:61/SEQ ID NO:15), Ab8 (SEQ ID NO:62/SEQ ID NO:16).

Thông thường, mỗi miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể bao gồm ba CDR. Miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng (HCDR1), CDR2 chuỗi nặng (HCDR2), và CDR3 chuỗi nặng (HCDR3). Miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1), CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2), và CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3). Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều CDR được chứa trong các miền biến đổi ưu tiên được mô tả ở đây.

Các ví dụ về các CDR như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở:

các CDR của Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:71), LCDR2 (SEQ ID NO:79), và LCDR3 (SEQ ID NO:87);

các CDR của Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:72), LCDR2 (SEQ ID NO:80), và LCDR3 (SEQ ID NO:88);

các CDR của Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:73), LCDR2 (SEQ ID NO:81), và LCDR3 (SEQ ID NO:89);

các CDR của Ab4 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:74), LCDR2 (SEQ ID NO:82), và LCDR3 (SEQ ID NO:90);

các CDR của Ab5 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:75), LCDR2 (SEQ ID NO:83), và LCDR3 (SEQ ID NO:91);

các CDR của Ab6 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:76), LCDR2 (SEQ ID NO:84), và LCDR3 (SEQ ID NO:92);

các CDR của Ab7 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:77), LCDR2 (SEQ ID NO:85), và LCDR3 (SEQ ID NO:93);

các CDR của Ab8 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:78), LCDR2 (SEQ ID NO:86), và LCDR3 (SEQ ID NO:94);

các CDR của Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:25), HCDR2 (SEQ ID NO:33), và HCDR3 (SEQ ID NO:41);

các CDR của Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:26), HCDR2 (SEQ ID NO:34), và HCDR3 (SEQ ID NO:42);

các CDR của Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:27), HCDR2 (SEQ ID NO:35), và HCDR3 (SEQ ID NO:43);

các CDR của Ab4 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:28), HCDR2 (SEQ ID NO:36), và HCDR3 (SEQ ID NO:44);

các CDR của Ab5 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:29), HCDR2 (SEQ ID NO:37), và HCDR3 (SEQ ID NO:45);

các CDR của Ab6 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:30), HCDR2 (SEQ ID NO:38), và HCDR3 (SEQ ID NO:46);

các CDR của Ab7 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:31), HCDR2 (SEQ ID NO:39), và HCDR3 (SEQ ID NO:47); và

các CDR của Ab8 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:32), HCDR2 (SEQ ID NO:40), và HCDR3 (SEQ ID NO:48).

Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm: A) polypeptit, ví dụ, chuỗi nhẹ, mà bao gồm LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, và 78; LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, và 86; và/hoặc LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, và 94; và/hoặc B) polypeptit, ví dụ, chuỗi nặng, mà bao gồm HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, và 32; HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, và 40; và/hoặc HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, và 48.

Theo các phương án khác, protein liên kết kháng nguyên bao gồm A) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ mà bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3 có trình tự bất kỳ trong số các trình tự của Ab1 LCv, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, và Ab8 LCv, và B) trình tự axit amin của chuỗi nặng mà bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có trình tự bất kỳ trong số các trình tự của Ab1 HCv, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, và Ab8 HCv.

Theo các phương án cụ thể, các CDR bao gồm không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, hoặc không quá sáu sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ CDR được lấy làm ví dụ trình bày ở đây.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, và 70. Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24. Các khía cạnh khác theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa A) miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, và 70, và B) miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24.

Các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm vùng cố định bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vùng cố định chuỗi nhẹ này có thể là, ví dụ, vùng cố định chuỗi nhẹ

dạng kapa hoặc lam-đa, ví dụ, vùng cố định chuỗi nhẹ dạng kapa hoặc lam-đa người. Vùng cố định chuỗi nặng có thể là, ví dụ, vùng cố định chuỗi nặng dạng alpha, delta, epsilon, gama, hoặc mu, ví dụ, vùng cố định chuỗi nặng dạng alpha, delta, epsilon, gama, hoặc mu người. Theo một phương án vùng cố định chuỗi nhẹ hoặc vùng cố định chuỗi nặng là đoạn, dẫn xuất, biến thể, hoặc đột biến của vùng cố định tồn tại tự nhiên.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, và 70 có không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, không quá sáu, không quá bảy, không quá tám, không quá chín, hoặc không quá mười sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin. Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24 có không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, không quá sáu, không quá bảy, không quá tám, không quá chín, hoặc không quá mười sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin. Các khía cạnh khác theo sáng chế bao gồm các kháng thể chứa A) chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, và 70 có không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, không quá sáu, không quá bảy, không quá tám, không quá chín, hoặc không quá mười sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin, và B) vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24 có không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, không quá sáu, không quá bảy, không quá tám, không quá chín, hoặc không quá mười sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin. Ví dụ, theo các phương án nhất định làm ví dụ, kháng thể bao gồm 1) biến thể của miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:66, trong đó phenylalanin tại vị trí 51 bị gây đột biến thành leuxin và/hoặc prolin tại vị trí 105 bị gây đột biến thành glyxin hoặc glutamin; 2) biến thể của miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:20, trong đó glutamin tại vị trí 1 bị đột biến thành axit glutamic và/hoặc arginin tại vị trí 16 bị đột biến thành glyxin; hoặc biến thể của miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:66, trong đó phenylalanin tại vị trí 51 bị gây đột biến thành leuxin và/hoặc prolin tại vị trí 105 bị gây đột biến thành glyxin hoặc glutamin và

biến thể của miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:20, trong đó glutamin tại vị trí 1 bị gây đột biến thành axit glutamic và/hoặc arginin tại vị trí 16 bị gây đột biến thành glyxin.

Theo một biến thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, và 70. Theo biến thể khác, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24. Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên bao gồm A) trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, và 70, và B) trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24.

Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm CDR3 chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm có các trình tự được trình bày trong các SEQ ID NO:87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, và 48. Theo các phương án cụ

thể, trình tự axit amin chứa không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, hoặc không quá sáu sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự làm ví dụ được trình bày trong các SEQ ID NO:87, 88, 89, 90, 91,92, 93,94, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, và 48. Như vậy, các phương án theo sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm có các trình tự được trình bày trong các SEQ ID NO:87, 88, 89, 90, 91,92, 93,94, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, và 48.

Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm CDR2 chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm có các trình tự được trình bày trong các SEQ ID NO:79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, và 40. Theo các phương án cụ thể, trình tự axit amin chứa không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không quá năm, hoặc không quá sáu sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự làm ví dụ được trình bày trong các SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, và 40. Như vậy, các phương án theo sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm có các trình tự được trình bày trong các SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, và 40.

Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm có các trình tự được trình bày trong các SEQ ID NO:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, và 32. Theo các phương án cụ thể, trình tự axit amin chứa không quá một, không quá hai, không quá ba, không quá bốn, không

quá năm, hoặc không quá sáu sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thể axit amin từ trình tự làm ví dụ được trình bày trong các SEQ ID NO: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, và 32. Như vậy, các phương án theo sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm có các trình tự được trình bày trong các SEQ ID NO: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, và 32.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các khung của các kháng thể thông thường, bao gồm các kháng thể người và các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể dime (diabodies), các kháng thể tối thiểu (minibodies), các kháng thể miền, các kháng thể tổng hợp (ở đây đôi khi được chỉ như “các giả kháng thể”), các kháng thể khảm, các thể dung hợp kháng thể (ở đây đôi khi được chỉ như “các thể cộng hợp kháng thể”), và các đoạn của mỗi kháng thể, tương ứng. Các CDR được mô tả trên đây, bao gồm các sự kết hợp khác nhau của các CDR, có thể được ghép vào khung bất kỳ trong số các khung sau đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” dùng để chỉ các dạng khác nhau của protein monone hoặc multimer chứa một hoặc nhiều chuỗi polypeptit liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, như được mô tả ở đây theo cách khác nhau. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể được tạo ra bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Theo các phương án bổ sung, các kháng thể được tạo ra bởi sự phân cắt bằng enzym hoặc phân cắt hóa học của các kháng thể có trong tự nhiên. Theo khía cạnh khác, kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm: a) kháng thể người; b) kháng thể được nhân hóa; c) kháng thể khảm; d) kháng thể đơn dòng; e) kháng thể đa dòng; f) kháng thể tái tổ hợp; g) đoạn liên kết kháng nguyên; h) kháng thể chuỗi đơn; i) kháng thể dime; j) kháng thể trimer (triabody), k) kháng thể tetramer (tetrabody), l) đoạn Fab; m) đoạn F(ab')₂, n) kháng thể IgA, o) kháng thể IgD, p) kháng thể IgE, q) kháng thể IgG1, r) kháng thể IgG2, s) kháng thể IgG3, t) kháng thể IgG4, và u) kháng thể IgM.

Vùng biến đổi bao gồm ít nhất ba CDR chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được gắn vào vùng khung (các vùng khung này được ký hiệu là FR1, FR2, FR3, và FR4). Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Các đơn vị cấu trúc của kháng thể thông thường đặc trưng bao gồm tetrame. Mỗi tetrame đặc trưng bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” và một chuỗi “nặng”. Phần đầu cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi có khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chịu trách nhiệm chính để nhận biết kháng nguyên. Phần đầu cùng cacboxy của mỗi chuỗi xác định vùng cố định chịu trách nhiệm chính cho chức năng yếu tố tác động. Các chuỗi nhẹ người được phân loại là các chuỗi nhẹ kapa hoặc lam-đa. Các chuỗi nặng được phân loại là mu, delta, gama, alpha, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. IgG có một vài lớp phụ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. IgM có các lớp phụ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở IgM1 và IgM2. Các phương án theo sáng chế bao gồm tất cả các lớp và các lớp phụ như vậy của các kháng thể mà kết hợp miền biến đổi hoặc CDR của các protein liên kết kháng nguyên, như được mô tả ở đây.

Một số kháng thể có trong tự nhiên, như các kháng thể được tìm thấy ở lạc đà và lạc đà không bướu, là các đime bao gồm hai chuỗi nặng và không bao gồm các chuỗi nhẹ. Sáng chế bao hàm các kháng thể đime có hai chuỗi nặng, hoặc các đoạn của nó, mà có thể liên kết với CD27L.

Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biểu lộ cụ thể cấu trúc chung giống nhau trong các vùng khung (framework region, FR) tương đối bảo thủ được nối bằng ba vùng siêu biến, nghĩa là, các vùng quyết định bổ sung hoặc các CDR. Các CDR chịu trách nhiệm chính để nhận biết và liên kết kháng nguyên. Các CDR của hai chuỗi trong mỗi cặp được nối tương ứng theo các vùng khung hoạt động, cho phép liên kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu cùng N đến đầu cùng C, cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đều chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Các axit amin được chỉ định cho mỗi miền là theo các định nghĩa của Kabat.

Các CDR cấu thành các điểm tiếp xúc bề mặt chính để liên kết kháng nguyên. CDR3 chuỗi nhẹ và, cụ thể là, CDR3 của chuỗi nặng có thể cấu thành các yếu tố quyết định quan

trọng nhất trong liên kết kháng nguyên ở các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng. Ở một số kháng thể, CDR3 chuỗi nặng xuất hiện để cấu thành vùng tiếp xúc chính giữa kháng nguyên và kháng thể. Các chương trình chọn lọc in vitro trong đó chỉ CDR3 được thay đổi có thể được sử dụng để làm thay đổi các thuộc tính liên kết của kháng thể hoặc xác định các gốc tham gia vào liên kết kháng nguyên.

Các kháng thể có trong tự nhiên thường bao gồm trình tự tín hiệu, mà hướng kháng thể vào con đường tế bào để tiết protein và thường không tồn tại ở kháng thể trưởng thành. Polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế có thể mã hóa trình tự tín hiệu tồn tại trong tự nhiên hoặc trình tự tín hiệu khác loại như được mô tả dưới đây.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể chứa từ một đến sáu CDR lấy làm ví dụ được mô tả ở đây. Các kháng thể theo sáng chế có thể có dạng bất kỳ bao gồm kháng thể IgM, IgG (bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA, hoặc IgE. Theo phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể dạng IgG, ví dụ, kháng thể IgG1.

Theo một số phương án, ví dụ khi protein liên kết kháng nguyên là kháng thể có các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ hoàn chỉnh, tất cả CDR là từ cùng loài, ví dụ, từ người. Theo cách khác, ví dụ theo các phương án trong đó protein liên kết kháng nguyên chứa ít hơn sáu CDR từ các trình tự được nêu trên đây, các CDR bổ sung có thể là từ loài khác hoặc có thể là các CDR người khác với các CDR được mô tả trong các trình tự làm ví dụ. Ví dụ, các vùng HCDR3 và LCDR3 từ các trình tự thích hợp được nhận biết ở đây có thể được sử dụng với HCDR1, HCDR2, LCDR1, và LCDR2 tùy ý được chọn từ loài thay thế hoặc các trình tự kháng thể người khác, hoặc các tổ hợp của chúng. Ví dụ, các CDR theo sáng chế có thể thay thế các vùng CDR của các kháng thể khảm hoặc được nhân hóa liên quan về mặt thương mại.

Các phương án cụ thể sử dụng các thành phần khung của các protein liên kết kháng nguyên mà là các thành phần của người. Tuy nhiên, theo một số phương án, các thành phần khung này có thể là hỗn hợp từ các loài khác nhau. Được hiểu theo cách thông thường, nếu protein liên kết kháng nguyên là kháng thể, kháng thể này có thể là kháng thể khảm và/hoặc

kháng thể được nhân hóa. Nhìn chung, cả “các kháng thể khảm” và các kháng thể được nhân hóa” đều dùng để chỉ các kháng thể mà kết hợp các vùng từ nhiều hơn một loài. Ví dụ, “các kháng thể khảm” thông thường bao gồm (các) vùng biến đổi từ chuột nhắt (hoặc chuột cống, trong một số trường hợp) và (các) vùng cố định từ người.

“Các kháng thể được nhân hóa” nhìn chung dùng để chỉ các kháng thể không phải của người mà có các vùng khung trong miền biến đổi được đổi với các trình tự được tìm thấy ở các kháng thể của người. Nói chung, trong kháng thể được nhân hóa, toàn bộ kháng thể, ngoại trừ một hoặc nhiều CDR, được mã hóa bởi polynucleotit có nguồn gốc từ người hoặc là giống hệt với kháng thể như vậy ngoại trừ một hoặc nhiều CDR. Các CDR, một số hoặc tất cả trong số đó được mã hóa bởi các axit nucleic có nguồn gốc từ sinh vật không phải người, được ghép vào khung phiên beta của vùng biến đổi của kháng thể người để tạo ra kháng thể, độ đặc hiệu của nó được xác định bằng các CDR được ghép vào. Việc tạo các kháng thể như vậy được mô tả trong, ví dụ, Công bố đơn số Quốc tế số WO 92/11018, Jones 1986, *Nature* 321:522-525, Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536. Các kháng thể được nhân hóa có thể cũng được tạo ra bằng cách sử dụng những con chuột nhắt có hệ miễn dịch được thiết kế di truyền. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Theo các phương án làm ví dụ được mô tả ở đây, các CDR được nhận biết là của người, và như vậy cả kháng thể được nhân hóa và các kháng thể khảm trong điều kiện này bao gồm một số CDR không phải của người; ví dụ, các kháng thể được nhân hóa có thể được tạo ra chứa các vùng HCDR3 và LCDR3, có một hoặc nhiều vùng CDR khác có nguồn gốc từ loài khác.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là kháng thể đa đặc hiệu, và đáng chú ý là kháng thể đặc hiệu kép, đôi khi cũng được gọi là “kháng thể dime.” Các kháng thể này là các kháng thể mà liên kết với hai hoặc nhiều hơn các kháng nguyên khác nhau hoặc các epitop khác nhau ở kháng nguyên đơn. Theo các phương án cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép liên kết với CD27L và kháng nguyên trong tế bào yếu tố tác động ở người (ví dụ, tế bào T). Các kháng thể như vậy là hữu dụng trong việc nhắm đích đáp ứng tế bào yếu tố tác động kháng các tế bào biểu hiện CD27L, như tế bào khối u. Theo các phương án ưu tiên, kháng nguyên tế bào yếu tố tác động ở người là CD3. Patent Mỹ Số

7.235.641. Các phương pháp tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp như vậy liên quan đến việc thiết kế phần Fc của các chuỗi nặng như để tạo ra “các cục” và “các lỗ” tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra dị đime của các chuỗi nặng khi được cùng biểu hiện trong tế bào. U.S. 7.695.963. Phương pháp khác cũng liên quan đến việc thiết kế phần Fc của chuỗi nặng nhưng sử dụng thiết bị lái tĩnh điện để kích thích tạo dị đime trong khi ngăn cản tạo đồng đime của các chuỗi nặng khi được cùng biểu hiện ở tế bào. Công bố đơn Quốc tế số WO 09/089.004, tài liệu này toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là kháng thể tối thiểu. Các kháng thể tối thiểu là các protein tương tự kháng thể được tối thiểu hóa chứa scFv được nối với miền CH3. Hu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là kháng thể miền; tham khảo, ví dụ Patent Mỹ Số 6.248.516. Các kháng thể miền (dAb) là các miền liên kết chức năng của các kháng thể, tương ứng với các vùng biến đổi của các chuỗi nặng (VH) hoặc các chuỗi nhẹ (VL) của các kháng thể của người. Các dAB có khối lượng phân tử khoảng 13kDa, hoặc nhỏ hơn một phần mười kích thước của kháng thể hoàn chỉnh. Các dAB được biểu hiện tốt ở nhiều vật chủ bao gồm các hệ tế bào chủ vi khuẩn, nấm men, và động vật có vú. Ngoài ra, các dAB có tính bền vững cao và giữ lại hoạt tính thậm chí sau khi phải chịu các điều kiện khắc nghiệt, như đông khô hoặc biến tính do nhiệt. *Tham khảo*, ví dụ, Patent Mỹ 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; Chuỗi Patent Mỹ (US Serial) Số 2004/0110941; Patent Châu Âu 0368684; Patent Mỹ 6.696.245, Công bố đơn Quốc tế số WO04/058821, WO04/003019 và WO03/002609.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là đoạn kháng thể, mà là đoạn của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được nêu ở đây mà giữ lại độ đặc hiệu liên kết với CD27L. Theo các phương án khác, các protein liên kết kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các đoạn F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, hoặc Fv chuỗi đơn. Ở mức tối thiểu, kháng thể, theo ý nghĩa ở đây, bao gồm polypeptit mà có thể liên kết đặc hiệu với CD27L chứa tất cả hoặc một phần của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng, như một hoặc nhiều CDR.

Các ví dụ khác về các đoạn kháng thể liên kết với CD27L bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, (i) đoạn Fab gồm các miền VL, VH, CL và CH1, (ii) đoạn Fd bao gồm các miền VH và CH1, (iii) đoạn Fv gồm các miền VL và VH của kháng thể đơn; (iv) đoạn dAb (Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341:544-546) mà gồm vùng biến đổi đơn, (v) các vùng CDR được phân lập, (vi) các đoạn F(ab')₂, đoạn hóa trị hai chứa hai đoạn Fab được liên kết (vii) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó miền VH và miền VL được nối bằng cầu nối peptit mà cho phép hai miền này liên kết để tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên (Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426, Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (viii) các đime Fv chuỗi đơn đặc hiệu kép (PCT/US92/09965) và (ix) "các kháng thể đime" hoặc "các kháng thể trime", các đoạn đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu được kiến tạo bằng sự dung hợp gen (Tomlinson *et al.*, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448). Các đoạn kháng thể có thể được biến đổi. Ví dụ, các phân tử có thể được làm bền vững bằng cách kết hợp các cầu disulfua nối các miền VH và VL (Reiter *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các phương án trong đó các thành phần không phải CDR của các đoạn này là các trình tự ở người.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là kháng thể hoàn chỉnh của người. Theo phương án này, như được nêu trên đây, các cấu trúc cụ thể bao gồm các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được mô tả chứa các vùng CDR. Các phương án bổ sung sử dụng một hoặc nhiều CDR theo sáng chế, có các CDR, các vùng khung, các vùng J và D, các vùng cố định, v.v., lấy từ các kháng thể khác của người. Ví dụ, các CDR theo sáng chế có thể thay thế các CDR của số lượng các kháng thể của người bất kỳ, cụ thể là các kháng thể thương phẩm liên quan.

Các kháng thể chuỗi đơn có thể được tạo ra bằng cách nối các đoạn của miền biến đổi (vùng Fv) chuỗi nhẹ và chuỗi nặng qua cầu nối axit amin (cầu nối peptit ngắn), tạo ra chuỗi polypeptit đơn. Các Fv chuỗi đơn (scFv) như vậy được tạo ra bằng cách dung hợp ADN mã hóa cầu nối peptit giữa các ADN mã hóa hai polypeptit miền biến đổi (V_L và V_H). Các polypeptit tạo ra có thể tự cuộn lại để tạo ra các monome liên kết kháng nguyên, hoặc chúng có thể tạo ra các multime (ví dụ, các đime, các trime, hoặc các tetrame), phụ thuộc

vào độ dài của cầu nối linh hoạt giữa hai miền biến đổi (Kortt *et al.*, 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Bằng cách kết hợp các polypeptit khác nhau chứa V_L và V_H, một polypeptit có thể tạo ra các scFv multime mà liên kết với các epitop khác nhau (Kriangkum *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Các kỹ thuật được phát triển để tạo các kháng thể chuỗi đơn bao gồm các kỹ thuật được mô tả trong Patent Mỹ Số 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Các kháng thể chuỗi đơn nhận được từ các kháng thể được đề xuất ở đây (bao gồm nhưng không bị giới hạn ở scFv chứa các tổ hợp miền biến đổi của Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:63/SEQ ID NO:17), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:64/SEQ ID NO:18), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:65/SEQ ID NO:19), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:66/SEQ ID NO:20), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:67/SEQ ID NO:21), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:68/SEQ ID NO:22), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:69/SEQ ID NO:23), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:70/SEQ ID NO:24), và các sự kết hợp của chúng được bao gồm trong sáng chế này.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là protein kháng thể dung hợp (đôi khi được chỉ ở đây như “thể cộng hợp kháng thể”). Đối tượng cùng cộng hợp có thể là protein hoặc không phải protein; đối tượng không phải protein nói chung được tạo ra bằng cách sử dụng các nhóm chức trên protein liên kết kháng nguyên và trên đối tượng cùng cộng hợp. Theo các phương án cụ thể, kháng thể được cộng hợp với hóa chất không phải protein (thuốc) để tạo ra thể cộng hợp thuốc -kháng thể. Các thể cộng hợp thuốc - kháng thể và các phương pháp làm ví dụ tạo ra các thể cộng hợp như vậy được thảo luận dưới đây.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên CD27L là chất tương tự kháng thể, đôi khi được gọi là “các kháng thể tổng hợp.” Ví dụ, một loạt nghiên cứu sử dụng các khung protein thay thế hoặc các khung nhân tạo có các CDR được ghép. Các khung như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các đột biến được đưa vào để làm bền vững cấu trúc không gian ba chiều của protein liên kết cũng như toàn bộ các khung tổng hợp gồm ví dụ các polyme tương hợp sinh học. *Tham khảo*, ví dụ, Korndorfer *et al.*, 2003, *Proteins*:

Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Ngoài ra, các giả kháng thể peptit (“peptide antibody mimetics, PAMs”) có thể được sử dụng, cũng như hoạt động dựa trên các giả kháng thể bằng cách sử dụng các thành phần liên kết với fibronectin làm khung.

Thuật ngữ “protein,” như được sử dụng ở đây, nghĩa là ít nhất hai axit amin được liên kết cộng hóa trị, bao gồm các protein, các polypeptit, các oligopeptit và các peptit. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều axit amin liên kết cộng hóa trị được gắn bởi liên kết peptit. Protein có thể được cấu thành từ các axit amin tồn tại trong tự nhiên và các liên kết peptit, ví dụ khi protein được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách sử dụng các hệ biểu hiện và các tế bào chủ, như được nêu dưới đây. Theo cách khác, protein có thể bao gồm các axit amin tổng hợp (ví dụ, homophenylalanin, xitruilin, ornithin, và norleuxin), hoặc các cấu trúc bất chức peptit, nghĩa là, “các chất tương tự peptit hoặc các chất tương tự protein”, như các peptoid (tham khảo, Simon *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), mà có thể kháng với các proteaza hoặc các điều kiện sinh lý và/hoặc các điều kiện bảo quản khác. Các axit amin tổng hợp như vậy có thể được kết hợp cụ thể khi protein liên kết kháng nguyên được tổng hợp *in vitro* bằng các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, sự kết hợp bất kỳ của các gốc/các cấu trúc bất chức peptit, tổng hợp và tồn tại trong tự nhiên có thể được sử dụng. “Axit amin” cũng bao gồm các gốc imino axit như prolin và hydroxyprolin. “nhóm R” hoặc “mạch bên” của axit amin có thể có cấu hình (L) hoặc (S). Theo phương án cụ thể, các axit amin có cấu hình (L) hoặc (S).

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp mà liên kết với CD27L và, theo một số phương án, CD27L người tái tổ hợp hoặc một phần của nó. Trong bản mô tả này, “protein tái tổ hợp” là protein được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật và các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, nghĩa là, qua sự biểu hiện của axit nucleic tái tổ hợp như được mô tả ở đây. Các phương pháp và các kỹ thuật để tạo ra các protein tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương án theo sáng chế bao gồm các

protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp mà liên kết với CD27L kiểu đại và các biến thể của nó.

“Cơ bản gồm” nghĩa là trình tự axit amin có thể khác nhau bởi khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15% so với trình tự SEQ ID NO: được trích dẫn và vẫn giữ lại hoạt tính sinh học, như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế là các protein được phân lập hoặc các protein cơ bản tinh khiết. Protein “được phân lập” không kèm theo ít nhất một số vật liệu mà protein thường kết hợp với chúng ở trạng thái tự nhiên của nó, ví dụ cấu thành ít nhất khoảng 5%, hoặc ít nhất khoảng 50% theo khối lượng của protein tổng số ở mẫu đưa ra. Cần hiểu rằng protein được phân lập có thể cấu thành từ 5 đến 99,9% theo khối lượng của tổng hàm lượng protein phụ thuộc vào các trường hợp. Ví dụ, protein có thể được tạo ra có nồng độ cao hơn rõ rệt bằng sử dụng trình tự khởi động có thể cảm ứng hoặc trình tự khởi động biểu hiện cao, sao cho protein được tạo ra có các mức nồng độ tăng. Định nghĩa này bao gồm việc sản xuất protein liên kết kháng nguyên ở một đa dạng các sinh vật và/hoặc các tế bào chủ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đối với các trình tự axit amin, độ tương đồng và/hoặc tương tự trình tự được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thuật toán độ tương đồng trình tự cục bộ của Smith và Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, thuật toán sắp xếp thẳng hàng tương đồng trình tự của Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, nghiên cứu phương pháp độ tương tự của Pearson và Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, các công việc thực hiện các thuật toán này trên máy tính (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong Gói Phần mềm Di truyền Wisconsin (Wisconsin Genetics Software Package), Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), chương trình trình tự Thích hợp Tốt nhất (Best Fit sequence program) được mô tả bởi Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. acid Res.* 12:387-395, tốt hơn là bằng cách sử dụng các cài đặt mặc định, hoặc bằng cách xem xét kỹ. Tốt hơn là, phần trăm độ tương đồng được tính toán bằng FastDB dựa trên các thông số sau: phạt ghép cặp sai là 1; phạt khoảng trống là 1; phạt kích thước trống là 0,33; và phạt liên kết là 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,"

Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Ví dụ về thuật toán hữu dụng là PILEUP. PILEUP tạo ra sự sắp xếp thẳng hàng nhiều trình tự từ nhóm các trình tự liên quan bằng cách sử dụng các cách so sánh lũy tiến từng cặp. Nó có thể cũng vẽ sơ đồ cây thể hiện các mối quan hệ theo nhóm được sử dụng để tạo ra sự sắp xếp thẳng hàng. PILEUP sử dụng dạng đơn giản hóa của phương pháp so sánh lũy tiến của Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; phương pháp này tương tự với phương pháp được mô tả bởi Higgins và Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Các thông số PILEUP hữu dụng bao gồm khoảng trống có ảnh hưởng mặc định là 3,00, độ dài khoảng trống có ảnh hưởng mặc định là 0,10, và các khoảng trống cuối có trọng số.

Ví dụ khác về thuật toán hữu dụng là thuật toán BLAST, được mô tả trong: Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; và Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Chương trình BLAST đặc biệt hữu dụng là chương trình WU-BLAST-2 có được từ Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 sử dụng một vài các thông số nghiên cứu, phần lớn trong số đó được cài đặt các giá trị mặc định. Các thông số có thể điều chỉnh được cài đặt với các giá trị như sau: khẩu độ gối nhau =1, phân đoạn gối nhau =0,125, ngưỡng lệnh (T)=II. Các thông số HSP S và HSP S2 là các giá trị động và được thiết lập bằng chính chương trình phụ thuộc thành phần trình tự cụ thể và thành phần của cơ sở dữ liệu cụ thể đối với trình tự quan tâm được nghiên cứu; tuy nhiên, các giá trị này có thể được điều chỉnh để tăng độ nhạy.

Thuật toán hữu dụng bổ sung là BLAST có khoảng trống như được báo cáo bởi Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST có khoảng trống sử dụng các điểm số thể BLOSUM-62; thông số ngưỡng T được cài đặt đến 9; phương pháp cặp sắp xếp thẳng hàng của hai từ ngắn có điểm số lớn hơn hoặc bằng một vài giá trị ngưỡng nhằm tăng sự tương đồng (two-hit method) để tạo ra các đoạn kéo dài không có khoảng trống, tính các độ dài khoảng trống của k là $10+k$; X_u được cài đặt đến 16, và X_g được cài đặt đến 40 đối với giai đoạn nghiên cứu cơ sở dữ liệu và đến 67 đối với giai đoạn xuất của các

thuật toán. Các cách so sánh thẳng hàng có khoảng trống được tạo ra bằng điểm số tương ứng với khoảng 22 bit.

Nói chung, mức =đồng nhất, tương tự, hoặc tương đồng axit amin giữa các CDR biến thể riêng rẽ ít nhất là 80% với các trình tự được mô tả ở đây, và cụ thể hơn, tốt hơn là các mức đồng nhất hoặc tương đồng tăng ít nhất là 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và gần như 100%. Theo cách tương tự, "phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit nucleic" liên quan đến trình tự axit nucleic của các protein liên kết được nhận biết ở đây được xác định là phần trăm của các gốc nucleotit trong trình tự ứng viên mà giống với các gốc nucleotit trong trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên. Phương pháp cụ thể sử dụng môđun BLASTN của WU-BLAST-2 cài đặt các thông số mặc định, có khẩu độ gối nhau và phân đoạn gối nhau được cài đặt là 1 và 0,125, theo tương ứng.

Nói chung, độ đồng nhất, tương tự, hoặc tương đồng trình tự axit nucleic giữa các trình tự nucleotit mã hóa các CDR biến thể riêng rẽ và các trình tự nucleotit được mô tả ở đây ít nhất là 80%, và cụ thể hơn là các mức đồng nhất hoặc tương tự tăng ít nhất là 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, và gần như 100%.

Như vậy, “biến thể CDR” là CDR có mức đồng nhất, tương tự, hoặc tương đồng được cụ thể hóa so với CDR gốc theo sáng chế, và có chung chức năng sinh học, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ đặc hiệu và/hoặc hoạt tính của CDR gốc.

Trong khi vị trí hoặc vùng để đưa sự thay đổi trình tự axit amin vào được xác định trước, về bản chất đột biến không cần được xác định trước. Ví dụ, để tối ưu hóa việc thực hiện đột biến tại vị trí đưa ra, gây đột biến ngẫu nhiên có thể thực hiện tại codon đích hoặc vùng đích và các biến thể CDR protein liên kết kháng nguyên biểu hiện được sàng lọc để phối hợp tối ưu hoạt tính mong muốn. Các kỹ thuật để tạo ra các đột biến thể tại các vị trí được xác định trước ở ADN có trình tự được biết đã được biết rõ, ví dụ, sự gây đột biến môi M13 và gây đột biến bằng PCR. Sàng lọc các thể đột biến được thực hiện bằng cách

sử dụng các thử nghiệm về các hoạt tính của protein liên kết kháng nguyên, như liên kết CD27L.

Các sự thể axit amin thường là các gốc đơn; Sự chèn thêm vào thường sẽ theo thứ tự từ khoảng một (1) đến khoảng hai mươi (20) gốc axit amin, mặc dù sự chèn thêm lớn hơn đáng kể có thể được dung nạp. Sự cắt bỏ có phạm vi từ khoảng một (1) đến khoảng hai mươi (20) gốc axit amin, mặc dù trong một số trường hợp số sự làm khuyết có thể lớn hơn nhiều.

Các sự thể, cắt bỏ, chèn thêm hoặc kết hợp bất kỳ của nó có thể được sử dụng để thu được dẫn xuất hoặc biến thể cuối cùng. Nói chung các biến đổi này được thực hiện ở một vài axit amin để tối thiểu hóa sự biến đổi của phân tử, cụ thể là tính sinh miễn dịch và độ đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên. Tuy nhiên, các biến đổi lớn hơn có thể được dung nạp ở các trường hợp nhất định. Các sự thể bảo toàn nói chung được tạo ra theo biểu đồ sau, được mô tả như Bảng 1.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Các gốc thế làm ví dụ
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Các biến đổi cơ bản trong tính giống nhau về chức năng hoặc tính miễn dịch được tạo ra bằng cách chọn lọc các gốc thế mà ít bảo toàn hơn các gốc thế được thể hiện ở BẢNG 1. Ví dụ, các gốc thế có thể được tạo ra có ảnh hưởng rõ rệt hơn: cấu trúc xương sống của polypeptit trong vùng biến đổi, ví dụ cấu trúc xoắn ốc alpha hoặc phiến beta; điện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử tại vị trí đích; hoặc kích thước lớn của mạch bên. Các gốc thế mà nói chung được dự kiến để tạo ra các biến đổi lớn nhất trong các tính chất của polypeptit là các gốc thế trong đó (a) gốc ưa nước, ví dụ, seryl hoặc threonyl, được thế cho (hoặc bởi) gốc kỵ nước, ví dụ, leuxyl, isoleuxyl, phenylalanyl, valyl hoặc alanyl; (b) xystein hoặc prolin thế cho (hoặc bởi) gốc bất kỳ khác; (c) gốc có mạch bên tích điện dương, ví dụ,

lysyl, arginyl, hoặc histidyl, được thế cho (hoặc bởi) gốc tích điện âm, ví dụ, glutamyl hoặc aspartyl; hoặc (d) gốc có mạch bên lớn, ví dụ, phenylalanin, được thế cho (hoặc bởi) một gốc không có mạch bên, ví dụ, glyxin.

Các biến thể thường biểu lộ cùng hoạt tính sinh học định tính và sẽ tạo ra cùng sự đáp ứng miễn dịch như thể tương tự tồn tại tự nhiên, mặc dù các biến thể cũng được chọn để biến đổi các đặc tính của các protein liên kết kháng nguyên khi cần. Theo cách khác, biến thể có thể được thiết kế sao cho hoạt tính sinh học của protein liên kết kháng nguyên bị thay đổi. Ví dụ, các vị trí glycosyl hóa có thể bị thay đổi hoặc bị loại bỏ như thảo luận ở đây.

Các dẫn xuất khác của các kháng thể CD27L trong phạm vi của sáng chế này bao gồm các thể cộng hợp cộng hóa trị hoặc kết tập của các kháng thể CD27L, hoặc các đoạn của nó, với các protein hoặc các polypeptit khác, như bằng cách biểu hiện các protein dung hợp tái tổ hợp chứa các polypeptit khác loại được dung hợp với đầu cùng N hoặc đầu cùng C của polypeptit kháng thể CD27L. Ví dụ, peptit được cộng hợp có thể là polypeptit tín hiệu (hoặc yếu tố dẫn) khác loại, ví dụ, yếu tố dẫn alpha ở nấm men, hoặc peptit như đuôi epitop. Các protein dung hợp chứa kháng thể CD27L có thể bao gồm các peptit được bổ sung để làm dễ dàng việc tinh chế hoặc nhận biết kháng thể CD27L (ví dụ, poly-His). Polypeptit kháng thể CD27L cũng có thể được nối với peptit FLAG như được mô tả trong Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6:1204, 1988, và Patent Mỹ 5.011.912. Peptit FLAG có tính kháng nguyên cao và cung cấp epitop liên kết thuận nghịch bởi kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody, mAb) đặc hiệu, cho phép thử nghiệm nhanh và protein tái tổ hợp biểu hiện được tinh chế dễ dàng. Các chất phản ứng hữu dụng để tạo ra các protein dung hợp trong đó peptit FLAG được dung hợp với polypeptit đưa ra là có bán sẵn (Sigma, St. Louis, MO).

Các oligome mà chứa một hoặc nhiều polypeptit kháng thể CD27L có thể được sử dụng làm các chất đối kháng CD27L. Các oligome có thể ở dạng các dime, các trime, hoặc các oligome cao hơn được nối với nhau theo cách cộng hóa trị hoặc được nối với nhau theo cách không cộng hóa trị. Các oligome chứa hai hoặc nhiều hơn polypeptit kháng thể CD27L được dự tính để sử dụng, với một ví dụ là đồng dime. Các oligome khác bao gồm

các dị đime, các trime cùng loại, các trime khác loại, các tetrame cùng loại, các tetrame khác loại, v.v.

Một phương án hướng đến các oligome chứa nhiều polypeptit kháng thể CD27L được nối qua các tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị giữa các gốc peptit được dung hợp với các polypeptit kháng thể CD27L. Các peptit như vậy có thể là các cầu nối peptit (các phân đệm), hoặc các peptit có tính chất thúc đẩy quá trình oligome hóa. Các khóa kéo leuxin và các polypeptit cụ thể nhận được từ các kháng thể là trong số các peptit mà có thể thúc đẩy quá trình oligome hóa của các polypeptit kháng thể CD27L được gắn vào đó, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo các phương án cụ thể, các oligome bao gồm từ hai đến bốn polypeptit kháng thể CD27L. Các gốc của kháng thể CD27L trong oligome có thể ở dạng bất kỳ trong số các dạng được mô tả trên đây, ví dụ, các biến thể hoặc các đoạn. Theo cách ưu tiên, các oligome bao gồm các polypeptit kháng thể CD27L mà có hoạt tính liên kết CD27L.

Theo một phương án, oligome được điều chế bằng cách sử dụng các polypeptit nhận được từ các globulin miễn dịch. Các protein dung hợp tạo ra chứa các polypeptit khác loại cụ thể được dung hợp với phần khác nhau của các polypeptit nhận được từ các kháng thể (bao gồm miền Fc) được mô tả, ví dụ, bởi Ashkenazi *et al.*, 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn *et al.*, 1990, Nature 344:677; và Hollenbaugh *et al.*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", trong *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, các trang 10.19.1 - 10.19.11.

Một phương án theo sáng chế hướng đến đime chứa hai protein dung hợp được tạo ra bằng cách dung hợp đoạn liên kết CD27L của kháng thể CD27L dung hợp với vùng Fc của kháng thể. Đime có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, chèn thêm gen dung hợp mã hóa protein dung hợp vào vectơ biểu hiện thích hợp, biểu hiện gen dung hợp trong các tế bào chủ được biến nạp với vectơ biểu hiện tái tổ hợp, và cho phép protein dung hợp được biểu hiện để tập hợp các phân tử kháng thể tương tự, và sau đó các liên kết disulfua giữa chuỗi tạo ra giữa các gốc Fc để tạo đime.

Thuật ngữ " polypeptit Fc" như được sử dụng ở đây bao gồm các dạng tự nhiên và các dạng đột biến của các polypeptit nhận được từ vùng Fc của kháng thể. Các dạng bị cắt cụt của các polypeptit như vậy chứa vùng bản lề thúc đẩy quá trình đime hóa cũng được bao gồm. Các protein dung hợp chứa các gốc Fc (và các oligome được tạo ra từ đó) tạo ra lợi thế để tinh chế dễ dàng bằng sắc ký ái lực trên các cột Protein A hoặc Protein G.

Một polypeptit Fc thích hợp, được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế số WO 93/10151 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), là polypeptit chuỗi đơn kéo dài từ vùng khớp nối đầu cùng N đến đầu cùng C tự nhiên của vùng Fc của kháng thể IgG ở người. Polypeptit Fc hữu dụng khác là protein Fc đột biến được mô tả trong Patent Mỹ 5.457.035 và trong Baum *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. Trình tự axit amin của đột biến này giống với trình tự axit amin của trình tự Fc tự nhiên được thể hiện trong Công bố đơn Quốc tế số WO 93/10151, ngoại trừ axit amin 19 bị thay đổi từ Leu thành Ala, axit amin 20 bị thay đổi từ Leu thành Glu, và axit amin 22 bị thay đổi từ Gly thành Ala. Thể đột biến này biểu lộ ái lực giảm đối với các thụ thể Fc.

Theo các phương án khác, phần biến đổi của các chuỗi nặng và/hoặc các chuỗi nhẹ của kháng thể CD27L có thể được thể cho phần biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo cách khác, oligome là protein dung hợp chứa nhiều polypeptit kháng thể CD27L, có hoặc không có các cầu nối peptit (các peptit đệm). Trong số các cầu nối peptit thích hợp là các cầu nối được mô tả trong các Patent Mỹ 4.751.180 và 4.935.233.

Phương pháp khác để tạo ra các dẫn xuất oligome kháng thể CD27L liên quan đến sử dụng khóa kéo leuxin. Các miền khóa kéo leuxin là các peptit mà thúc đẩy quá trình oligome hóa của các protein trong đó chúng được tìm thấy. Các khóa kéo leuxin được nhận biết đầu tiên trong một vài protein liên kết ADN (Landschulz *et al.*, 1988, *Science* 240:1759), và từ đó được tìm thấy ở một loạt các protein khác. Trong số các khóa kéo leuxin được biết là các peptit và các dẫn xuất của nó tồn tại trong tự nhiên mà đime hóa hoặc trime hóa. Các ví dụ về các miền khóa kéo leuxin thích hợp để tạo ra các protein oligome tan được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế số WO 94/10308, và khóa kéo leuxin

nhận được từ protein D hoạt động trên bề mặt (surfactant protein D, SPD) ở phổi được mô tả trong Hoppe *et al.*, 1994, *FEBS Letters* 344:191, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Sử dụng khóa kéo leuxin biến đổi mà cho phép trimer hóa ổn định của protein khác loại được dung hợp vào đó được mô tả trong Fanslow *et al.*, 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. Theo một cách tiếp cận, các protein dung hợp tái tổ hợp chứa đoạn kháng thể CD27L hoặc dẫn xuất dung hợp với peptit khóa kéo leuxin được biểu hiện ở các tế bào chủ thích hợp, và các đoạn kháng thể CD27L oligome hòa tan hoặc các dẫn xuất tạo ra được thu lại từ dịch nuôi cấy.

Các biến đổi cộng hóa trị của các protein liên kết kháng nguyên được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này, và nói chung, nhưng không phải luôn luôn, được thực hiện sau dịch mã. Ví dụ, một vài dạng biến đổi cộng hóa trị của protein liên kết kháng nguyên được đưa vào phân tử bằng các gốc axit amin phản ứng đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên với chất tạo dẫn xuất hữu cơ mà có khả năng phản ứng với các chuỗi bên được chọn hoặc các gốc đầu cùng N hoặc đầu cùng C.

Các gốc xystein thông thường nhất phản ứng với các α -haloaxetat (và các amin tương ứng), như axit cloaxetic hoặc cloraxetamit, để tạo ra các dẫn xuất cacboxymetyl hoặc cacboxyamidometyl. Các gốc xystein cũng được dẫn xuất bằng cách phản ứng với bromotrifloaxeton, axit α -bromo- β -(5-imidozoyl)propionic, cloroaxetyl phosphat, các N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfit, metyl 2-pyridyl disulfit, p-cloromercuribenzoat, 2-cloromercuri-4-nitrophenol, hoặc cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Các gốc histidyl được dẫn xuất bằng cách phản ứng với diethylpyrocacbonat tại độ pH 5,5-7,0 do chất này tương đối đặc hiệu đối với mạch bên histidyl. Para-bromophenaxyl bromua cũng là hữu dụng; phản ứng được thực hiện tốt hơn trong natri cacodylat 0,1M tại độ pH 6,0.

Lysinyl và các gốc đầu cùng amino phản ứng với anhydrit của axit suxinic hoặc các anhydrit của axit cacboxylic khác. Quá trình tạo dẫn xuất với các chất này có ảnh hưởng thuận nghịch về điện tích của các gốc lysinyl. Chất phản ứng thích hợp khác để tạo dẫn xuất các gốc chứa alpha-amino bao gồm các imidoeste như metyl picolinimidat; pyridoxal

phosphat; pyridoxal; cloroborohydrit; axit trinitrobenzenesulfonic; O-metylisourea; 2,4-pentanedion; và phản ứng với glyoxylat được xúc tác bởi transaminaza.

Các gốc arginyl được biến đổi bằng cách phản ứng với một hoặc một vài chất phản ứng thông thường, trong số này là phenylglyoxal, 2,3-butanedion, 1,2-xyclohexanedion, và ninhydrin. Quá trình tạo dẫn xuất của các gốc arginin đòi hỏi phản ứng được thực hiện trong các điều kiện kiềm do pK_a cao của nhóm chức guanidin. Hơn nữa, các chất phản ứng này có thể phản ứng với các nhóm có lysin cũng như nhóm amino epsilon của arginin.

Sự biến đổi đặc hiệu của các gốc tyrosyl có thể được tạo ra, với quan tâm đặc biệt vào việc đưa các chất đánh dấu quang phổ vào các gốc tyrosyl bằng phản ứng với các hợp chất diazonium thơm hoặc tetranitrometan. Thông thường nhất, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng để tạo ra loại O-axetyl tyrosyl và các dẫn xuất 3-nitro, tương ứng. Các gốc tyrosyl được iốt hóa (iodinated) bằng cách sử dụng ^{125}I hoặc ^{131}I để tạo ra các protein được đánh dấu sử dụng trong xét nghiệm phóng xạ miễn dịch, phương pháp cloramin T được mô tả trên đây là thích hợp.

Các nhóm cacboxyl mạch bên (aspartyl hoặc glutamyl) được biến đổi chọn lọc bằng cách phản ứng với các cacbodiimit ($R'-N=C=N-R'$), trong đó R và R' là các nhóm alkyl tùy ý khác nhau, như 1-xyclohexyl-3-(2-morpholiny-4-etyl) cacbodiimit hoặc 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl) cacbodiimit. Hơn nữa, các gốc aspartyl và glutamyl được biến đổi thành các gốc asparaginy-yl và glutaminy-yl bằng phản ứng với các ion amoni.

Việc dẫn xuất với các chất hai chức năng là hữu dụng để liên kết chéo các protein liên kết kháng nguyên với chất nền hỗ trợ không tan trong nước hoặc bề mặt để sử dụng trong một loạt các phương pháp. Thông thường các chất liên kết chéo được sử dụng bao gồm, ví dụ, 1,1-bis(diazoaxetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyt, các N-hydroxysuxinimit este, ví dụ, các este có axit 4-azidosalixylic, các imidoeste hai chức năng giống nhau, bao gồm các disuxinimidyl este như 3,3'-ditiobis(suxinimidylpropionat), và các maleimit hai chức năng như bis-N-maleimido-1,8-octan. Các chất tạo dẫn xuất như metyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat tạo ra các chất trung gian có thể hoạt hóa bằng ánh sáng mà có khả năng tạo ra các liên kết chéo khi có ánh sáng. Theo cách khác, các chất nền phản

ứng không tan trong nước như các cacbohydrat được hoạt hóa bởi xyanogen bromua và các cơ chất phản ứng được mô tả trong các Patent Mỹ Số 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; và 4.330.440 được sử dụng để cố định protein.

Các gốc glutaminyl và asparaginyl thường xuyên bị khử amit (deamidated) thành các gốc glutamyl và aspartyl, tương ứng. Theo cách khác, các gốc này bị khử amit trong các điều kiện axit nhẹ. Dạng khác của các gốc này nằm trong phạm vi của sáng chế này.

Các biến đổi khác bao gồm hydroxyl hóa prolin và lysin, phosphoyl hóa các nhóm hydroxyl của các gốc seryl hoặc threonyl, metyl hóa các nhóm α -amino của các chuỗi bên lysin, arginin, và histidin (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), axetyl hóa amin đầu cùng N, và amit hóa nhóm cacboxyl bất kỳ đầu cùng C.

Dạng biến đổi cộng hóa trị khác của protein liên kết kháng nguyên được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này bao gồm thay đổi mẫu hình glycosyl hóa của protein. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các mẫu hình glycosyl hóa có thể phụ thuộc vào cả trình tự của protein (*ví dụ*, sự có mặt hoặc vắng mặt của các gốc axit amin glycosyl hóa cụ thể, được thảo luận dưới đây), hoặc tế bào chủ hoặc sinh vật chủ mà trong đó protein này được tạo ra. Các hệ biểu hiện cụ thể được thảo luận dưới đây.

Quá trình glycosyl hóa các polypeptit thường được liên kết đầu N hoặc liên kết đầu O. Được liên kết đầu N dùng để chỉ sự gắn gốc cacbohydrat vào mạch bên của gốc asparagin. Các trình tự ba peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận biết để gắn gốc cacbohydrat vào mạch bên của asparagin nhờ enzym. Như vậy, các trình tự ba peptit này có mặt trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Sự glycosyl hóa được liên kết đầu O chỉ sự gắn của một trong số các đường N-axetylgalactosamin, galactoza, hoặc xyloza, vào axit hydroxyamino, thông thường nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin có thể cũng được sử dụng.

Sự bổ sung các vị trí glycosyl hóa vào protein liên kết kháng nguyên thường được thực hiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự ba

peptit được mô tả trên đây (đối với các vị trí glycosyl hóa N-liên kết). Biến đổi này có thể cũng được tạo ra bằng cách bổ sung, hoặc thay thế bởi, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin với trình tự ban đầu (đối với các vị trí glycosyl hóa O-liên kết). Để dễ dàng, trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên tốt hơn là bị biến đổi nhờ các mức ADN biến đổi, cụ thể là bằng cách gây đột biến ADN mã hóa polypeptit đích tại các bazơ được chọn trước sao cho các mã được tạo ra sẽ được dịch thành các axit amin mong muốn.

Các cách khác để tăng số các gốc cacbohydrat ở protein liên kết kháng nguyên là các glycosit kết hợp bằng hóa học hoặc kết hợp nhờ hoạt tính enzym vào protein. Các quy trình này có lợi thế bởi vì chúng không đòi hỏi tạo ra protein ở tế bào chủ có các khả năng glycosyl hóa để glycosyl hóa được liên kết đầu N và O. Phụ thuộc vào phương thức kết hợp được sử dụng, (các) đường có thể được gắn với (a) arginin và histidin, (b) các nhóm cacboxyl tự do, (c) các nhóm sulfhydryl tự do như các nhóm của xystein, (d) các nhóm hydroxyl tự do như các nhóm của serin, threonin, hoặc hydroxyprolin, (e) các gốc thơm như các gốc của phenylalanin, tyrosin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế số WO 87/05330 ngày 11 tháng 9, 1987, và trong Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Sự loại bỏ các gốc cacbohydrat có mặt trong protein liên kết kháng nguyên ban đầu có thể được thực hiện theo cách hóa học hoặc bằng hoạt tính enzym. Quá trình loại glycosyl hóa học cần protein tiếp xúc với hợp chất axit triflometanesulfonic, hoặc hợp chất tương đương. Xử lý này dẫn đến sự phân cắt của hầu hết hoặc tất cả các đường ngoại trừ đường liên kết (N-acetylglucosamin hoặc N-acetylgalactosamin), trong khi vẫn giữ polypeptit không bị ảnh hưởng. Quá trình loại glycosyl theo cách hóa học được mô tả bởi Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 và bởi Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Sự phân cắt bằng hoạt tính enzym các gốc cacbohydrat ở các polypeptit có thể đạt được bằng cách sử dụng một loạt các endo- và exo-glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. Quá trình glycosyl hóa tại các vị trí glycosyl hóa tiềm năng có thể được ngăn chặn bằng việc sử dụng hợp chất tunicamixin như được mô tả bởi Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Tunicamixin phong bế sự tạo thành các liên kết protein-N-glycosit.

Dạng biến đổi cộng hóa trị khác của protein liên kết kháng nguyên bao gồm nối protein liên kết kháng nguyên này với các polyme khác không phải protein, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các rượu đa chức khác nhau như polyetylen glycol, polypropylen glycol hoặc các polyoxyalkylen, theo cách được trình bày trong các Patent Mỹ Số 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 hoặc 4.179.337. Ngoài ra, như được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các axit amin thế có thể được tạo ra ở các vị trí khác nhau trong protein liên kết kháng nguyên để dễ dàng bổ sung các polyme như PEG.

Theo một số phương án, sự biến đổi cộng hóa trị của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm sự bổ sung một hoặc nhiều chất đánh dấu.

Thuật ngữ "nhóm đánh dấu" nghĩa là chất đánh dấu bất kỳ có thể phát hiện được. Các ví dụ về các nhóm đánh dấu thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các nhóm sau: các đồng vị phóng xạ hoặc các hạt nhân phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), các nhóm huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, các lanthanit phospho), các nhóm có hoạt tính enzym (ví dụ, peroxidaza của cây cải ngựa, β -galactosidaza, luxiferaza, alkaline phosphatase), các nhóm phát quang hóa học, các nhóm biotiny, hoặc các epitop polypeptit xác định trước được nhận biết bằng chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp đôi trong khóa kéo leuxin, các vị trí liên kết cho các kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các đuôi epitop). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được kết cặp với protein liên kết kháng nguyên qua các nhánh đệm có các chiều dài khác nhau để làm giảm trở ngại không gian có thể xảy ra. Các phương pháp khác để đánh dấu các protein là được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế này.

Nhìn chung, các chất đánh dấu nằm trong nhiều lớp, phụ thuộc vào thử nghiệm trong đó chúng được phát hiện: a) các chất đánh dấu đồng vị, mà có thể là các đồng vị phóng xạ hoặc các đồng vị nặng; b) các chất đánh dấu từ (ví dụ, các hạt từ); c) các gốc hoạt tính oxy hóa khử; d) các chất nhuộm quang học; các nhóm có hoạt tính enzym (ví dụ peroxidaza của cây cải ngựa, β -galactosidaza, luxiferaza, alkaline phosphatase); e) các nhóm được biotiny hóa; và f) các epitop polypeptit đã định trước được nhận biết bằng chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp đôi trong khóa kéo leuxin, các vị trí liên kết cho các kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các đuôi epitop, vv.). Theo một số phương

án, nhóm đánh dấu được kết cặp với protein liên kết kháng nguyên qua các nhánh đệm có các chiều dài khác nhau để làm giảm trở ngại không gian có thể xảy ra. Các phương pháp khác để đánh dấu các protein là được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế này.

Các chất đánh dấu đặc hiệu bao gồm các chất nhuộm quang học, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các nhóm hóa học mang màu, các phospho và các fluorophore, với chất phát huỳnh quang là đặc hiệu trong nhiều trường hợp. Các fluorophore có thể là các fluore “phân tử nhỏ”, hoặc các fluore có protein.

Theo “chất đánh dấu huỳnh quang” nghĩa là phân tử bất kỳ mà có thể được phát hiện qua các tính chất huỳnh quang vốn có của nó. Các chất đánh dấu huỳnh quang thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các florexin, rhodamin, tetramethylrhodamin, eosin, erythrosin, coumarin, các methyl-coumarin, pyren, Malachite xanh, stilben, Luxifer Vàng, Cascade BlueJ, Texas Đỏ, các IAEDAN, các EDAN, BODIPY FL, LC Đỏ 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Đỏ 705, Oregon xanh, các thuốc nhuộm Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Xanh, Cascade Vàng và R-phycoerythrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rhodamin, và Texas Đỏ (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Các thuốc nhuộm quang học thích hợp, bao gồm các fluorophore, được mô tả trong Molecular Probes Handbook bởi Richard P. Haugland, được đưa vào đây rõ ràng bằng cách viện dẫn.

Các chất đánh dấu huỳnh quang có protein thích hợp cũng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, protein huỳnh quang xanh lá cây, bao gồm Renilla, Ptilosarcus, hoặc loại Aequorea của GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Số Truy cập Ngân hàng Gen U55762), protein huỳnh quang xanh nước biển (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), protein huỳnh quang vàng được tăng cường (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luxiferaza (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidaza (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) và Renilla

(Công bố đơn Quốc tế số WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, các Patent Mỹ Số 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Tất cả các tài liệu tham khảo trích dẫn trên đây được đưa rõ ràng vào đây bằng cách viện dẫn.

Các polynucleotit mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CD27L

Được bao hàm trong sáng chế là các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CD27L, bao gồm các kháng thể, như được xác định ở đây. Các axit nucleic ưu tiên bao gồm các axit nucleic mã hóa các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng làm ví dụ được mô tả ở đây.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab1 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:49.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab2 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:50.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab4 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:51.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab5 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:52.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab6 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:53.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab7 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:54.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab8 LC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:55.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab1 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:3.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab2 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:4.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab4 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:5.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab5 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:6.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab6 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:7.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab7 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:8.

Axit nucleic làm ví dụ mã hóa Ab8 HC là axit nucleic chứa trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:9.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các biến thể polynucleotit (*ví dụ*, do tính thoái hóa) mã hóa các trình tự axit amin được mô tả ở đây.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm một loạt các phương án bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các phương án làm ví dụ sau.

Polynucleotit được phân lập, trong đó polynucleotit đã nêu mã hóa một hoặc nhiều polypeptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

A. 1. trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong các SEQ ID NO:63-70;

2. trình tự miền biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong các SEQ ID NO:17-24;

3. miền biến đổi chuỗi nhẹ của (1) và miền biến đổi chuỗi nặng của (2); và

B. Miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2, CDR3 và/hoặc miền biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2, CDR3 mà khác nhau không quá tổng số là ba sự bổ sung, sự thế, và/hoặc sự làm khuyết axit amin trong mỗi CDR từ các trình tự sau:

1. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:71), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:79), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:87) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:25), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:33), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:41) của Ab1;

2. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:72), CDR2 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:80), CDR3 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:88) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:26), CDR2 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:34), CDR3 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:42) của Ab2;

3. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:73), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:81), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:89) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:27), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:35), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:43) của Ab3;

4. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:74), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:82), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:90) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:28), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:36), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:44) của Ab4;

5. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:75), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:83), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:91) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:29), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:37), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:45) của Ab5;

6. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:76), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:84), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:92) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:30), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:38), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:46) của Ab6;

7. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:77), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:85), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:93) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:31), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:39), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:47) của Ab7; và

8. CDR1 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:78), CDR2 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:86), CDR3 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:94) hoặc CDR1 chuỗi nặng (SEQ ID NO:32), CDR2 chuỗi nặng (SEQ ID NO:40), CDR3 chuỗi nặng (SEQ ID NO:48) của Ab8.

Theo các phương án ưu tiên, polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic được phân lập là thành phần của protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với CD27L.

Các trình tự nucleotit tương ứng với các trình tự axit amin mô tả ở đây, được sử dụng như các mẫu dò hoặc các môi để phân lập các axit nucleic hoặc làm các trình tự truy vấn cho các tra cứu cơ sở dữ liệu, có thể đạt được bằng “sự dịch mã ngược” từ các trình tự axit amin, hoặc bằng cách nhận biết các vùng axit amin giống với các polypeptit mà trình tự ADN mã hóa các polypeptit này đã được nhận biết. Quy trình phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction, PCR) đã biết rõ có thể được sử dụng để phân lập và khuếch đại trình tự ADN mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CD27L hoặc sự kết hợp mong muốn của các đoạn polypeptit của protein liên kết kháng nguyên CD27L. Các oligonucleotit xác định các đầu cùng mong muốn của hỗn hợp các đoạn ADN được sử dụng làm các môi 5' và 3'. Các oligonucleotit này có thể chứa thêm các vị trí nhận biết cho các endonucleaza giới hạn, để tạo điều kiện cho việc chèn tổ hợp các đoạn ADN được khuếch đại vào vector biểu hiện. Các kỹ thuật PCR được mô tả trong Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; và *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm ADN và ARN ở cả dạng sợi đơn và sợi đôi, cũng như các trình tự bổ sung tương ứng. ADN bao gồm, ví dụ, cADN, ADN hệ gen, ADN được tổng hợp theo cách hóa học, ADN được khuếch đại bằng PCR, và các kết hợp của chúng. Các phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm các gen hoặc các phân tử cADN có chiều dài đầy đủ cũng như hỗn hợp các đoạn của nó. Các axit nucleic theo sáng chế nhận được theo cách ưu tiên từ các nguồn của người, nhưng sáng chế cũng bao gồm các axit nucleic nhận được từ loài không phải người.

"Axit nucleic được phân lập" là axit nucleic được phân tách từ các trình tự di truyền liên kế có mặt trong hệ gen của sinh vật mà từ đó axit nucleic này được phân lập, trong trường hợp các axit nucleic được phân lập từ các nguồn có trong tự nhiên. Trong trường hợp các axit nucleic được tổng hợp bằng hoạt tính enzym từ khuôn hoặc theo cách hóa học, ví dụ như các sản phẩm PCR, các phân tử cADN, hoặc các oligonucleotit, cần hiểu rằng các axit nucleic do kết quả từ các quá trình như vậy là các axit nucleic được phân lập. Phân tử axit nucleic được phân lập để chỉ phân tử axit nucleic ở dạng đoạn phân tách hoặc là

thành phần trong cấu trúc axit nucleic lớn hơn. Theo phương án ưu tiên, các axit nucleic này cơ bản không bị nhiễm nguyên liệu nội sinh. Phân tử axit nucleic tốt hơn là nhận được từ ADN hoặc ARN được phân lập ít nhất một lần ở dạng cơ bản tinh khiết và có định lượng hoặc nồng độ cho phép nhận biết, thao tác, và khôi phục lại các trình tự nucleotit thành phần của nó bằng các phương pháp hóa sinh chuẩn (như các phương pháp được phác thảo trong Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Các trình tự như vậy tốt hơn là được cung cấp và/hoặc được kiến tạo ở dạng khung đọc mở không bị đứt quãng bởi các trình tự không được dịch mã nội sinh, hoặc các intron, mà thường có mặt ở các gen tế bào nhân chuẩn. Các trình tự ADN không được dịch mã có thể có mặt ở đầu 5' hoặc 3' từ khung đọc mở, trong đó các trình tự này không cản trở thao tác hoặc biểu hiện của vùng mã hóa.

Sáng chế này cũng bao gồm các axit nucleic mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, và tốt hơn là trong các điều kiện nghiêm ngặt cao, với các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CD27L như được mô tả ở đây. Các thông số cơ bản ảnh hưởng đến các điều kiện lai lựa chọn và hướng dẫn để đặt các điều kiện thích hợp được trình bày bởi Sambrook, Fritsch, và Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harb hoặc Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., các chương 9 và 11; và *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., các mục 2.10 và 6.3-6.4), và có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên, ví dụ, độ dài và/hoặc thành phần bazơ của ADN. Một cách đạt được các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải liên quan đến sử dụng dung dịch rửa sơ bộ chứa 5 x SSC, SDS 0,5%, EDTA 1,0mM (độ pH 8,0), đệm lai chứa khoảng 50% formamit, 6 x SSC, và nhiệt độ lai khoảng 55 độ C (hoặc các dung dịch lai tương tự khác, như dung dịch chứa khoảng 50% formamit, có nhiệt độ lai khoảng 42 độ C), và các điều kiện rửa khoảng 60 độ C, trong 0,5 x SSC, SDS 0,1%. Nói chung, các điều kiện nghiêm ngặt cao được xác định như các điều kiện lai như trên đây, nhưng có quá trình rửa tại khoảng 68 độ C, 0,2 x SSC, SDS 0,1%. SSPE (1xSSPE là NaCl 0,15M, NaH₂PO₄ 10mM, và EDTA 1,25mM, độ pH 7,4) có thể thay cho SSC (1xSSC là NaCl 0,15M và natri xitrat 15mM) trong đệm lai và đệm rửa; các bước rửa được thực hiện trong 15 phút

sau khi quá trình lai hoàn thành. Nên hiểu là nhiệt độ rửa và nồng độ muối rửa có thể được điều chỉnh khi cần thiết để đạt được độ nghiêm ngặt mong muốn bằng các áp dụng nguyên tắc cơ bản chi phối các phản ứng lai và độ ổn định ADN sợi đôi, như được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả thêm dưới đây (tham khảo, ví dụ, Sambrook et al., 1989). Khi lai axit nucleic với axit nucleic đích có trình tự không được biết, độ dài của phân tử lai được cho là độ dài của axit nucleic lai. Khi các axit nucleic có trình tự đã biết được lai, độ dài của phân tử lai có thể được xác định bằng cách so sánh thẳng hàng các trình tự của các axit nucleic và nhận biết vùng hoặc các vùng có trình tự bổ sung tối ưu. Nhiệt độ lai cho các phân tử lai được đoán trước có chiều dài nhỏ hơn 50 cặp bazơ là 5 đến 10 độ C thấp hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của phân tử lai, trong đó T_m được xác định theo các phương trình sau. Đối với các phân tử lai có chiều dài nhỏ hơn 18 cặp bazơ, T_m (độ C) = $2(\text{số các bazơ A} + \text{T}) + 4(\text{số các bazơ G} + \text{C})$. Đối với các phân tử lai có chiều dài trên 18 cặp bazơ, T_m (độ C) = $81,5 + 16,6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ G} + \text{C}) - (600/N)$, trong đó N là số các bazơ trong phân tử lai, và $[\text{Na}^+]$ là nồng độ của các ion natri trong đệm lai ($[\text{Na}^+]$ đối với 1xSSC = 0,165M). Ưu tiên là mỗi axit nucleic lai như vậy có độ dài ít nhất 15 nucleotit (hoặc ưu tiên hơn ít nhất 18 nucleotit, hoặc ít nhất 20 nucleotit, hoặc ít nhất 25 nucleotit, hoặc ít nhất 30 nucleotit, hoặc ít nhất 40 nucleotit, hoặc ưu tiên nhất ít nhất 50 nucleotit), hoặc có độ dài ít nhất 25% (ưu tiên hơn ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, và ưu tiên nhất ít nhất 80%) độ dài của axit nucleic theo sáng chế mà nó lai với, và có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% (ưu tiên hơn ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%, và ưu tiên nhất ít nhất 99,5%) với axit nucleic theo sáng chế mà nó lai với, trong đó độ tương đồng trình tự được xác định bằng cách so sánh các trình tự của các axit nucleic lai khi được sắp xếp thẳng hàng sao cho cực đại hóa phần gộp nhau và độ tương đồng trong khi tối thiểu hóa các khoảng trống trình tự như được mô tả chi tiết hơn trên đây.

Các biến thể theo sáng chế thường được tạo ra bằng cách tạo ra đột biến đặc hiệu vị trí ở các nucleotit trong ADN mã hóa protein liên kết kháng nguyên, bằng cách sử dụng

đột biến cat-xet hoặc PCR tạo ra hoặc các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, để tạo ra ADN mã hóa biến thể, và sau đó biểu hiện ADN tái tổ hợp ở môi trường nuôi cấy tế bào như được phác thảo ở đây. Tuy nhiên, các đoạn protein liên kết kháng nguyên chứa các CDR biến thể có đến khoảng 100-150 gốc có thể được tạo ra bằng tổng hợp *in vitro* bằng cách sử dụng các kỹ thuật được thiết lập. Các biến thể biểu lộ cụ thể hoạt tính sinh học định tính giống như chất tương tự tồn tại trong tự nhiên, ví dụ, liên kết với CD27L, mặc dù các biến thể cũng có thể được chọn lọc với các đặc tính biến đổi như sẽ được nêu đầy đủ hơn dưới đây.

Như sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, do tính thoái hóa của mã di truyền, số các axit nucleic cực lớn có thể được tạo ra, tất cả trong số đó mã hóa các CDR (và các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ hoặc các thành phần khác của protein liên kết kháng nguyên) theo sáng chế này. Như vậy, với việc xác định trình tự axit amin cụ thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra số lượng bất kỳ các axit nucleic khác nhau, bằng cách biến đổi đơn giản trình tự của một hoặc nhiều codon theo cách mà không thay đổi trình tự axit amin của protein được mã hóa.

Sáng chế này cũng đề xuất các hệ và các cấu trúc biểu hiện trong dạng các plasmit, các vector biểu hiện, các cat-xet phiên mã hoặc biểu hiện mà bao gồm ít nhất một polynucleotit như trên. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào chủ chứa các hệ hoặc các cấu trúc biểu hiện như vậy.

Cụ thể, các vector biểu hiện được sử dụng ở tế bào chủ bất kỳ sẽ chứa các trình tự để duy trì plasmit và để nhân dòng và biểu hiện các trình tự nucleotit ngoại sinh. Các trình tự như vậy, được chỉ chung như "các trình tự tạo sườn" theo các phương án nhất định sẽ bao gồm cụ thể một hoặc nhiều trình tự nucleotit sau: trình tự khởi động, một hoặc nhiều trình tự tăng cường, điểm khởi đầu sao chép, trình tự kết thúc phiên mã, trình tự intron hoàn chỉnh chứa vị trí nối thể cho và thể nhận, trình tự mã hóa trình tự dẫn cho sự tiết polypeptit, vị trí liên kết ribosom, trình tự polyadenyl hóa, vùng đa cầu nối để chèn thêm axit nucleic mã hóa polypeptit để được biểu hiện, và yếu tố chỉ thị chọn lọc. Mỗi trình tự trong số các trình tự này được thảo luận dưới đây.

Một cách tùy ý, vector có thể chứa trình tự mã hóa "đuôi", nghĩa là, phân tử oligonucleotit nằm tại đầu 5' hoặc 3' của trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên CD27L; trình tự oligonucleotit mã hóa polyHis (như hexaHis), hoặc "đuôi" khác như FLAG, HA (hemagglutinin của virus cúm), hoặc *myc*, cho các kháng thể có bán sẵn hiện có. Đuôi này thường được dung hợp với polypeptit khi polypeptit biểu hiện, và có thể sử dụng như các cách để tinh chế ái lực hoặc phát hiện protein liên kết kháng nguyên CD27L từ tế bào chủ. Có thể thực hiện tinh chế ái lực, ví dụ, bằng sắc ký cột bằng cách sử dụng các kháng thể kháng đuôi như chất nền ái lực. Một cách tùy ý, đuôi này có thể sau đó bị loại bỏ khỏi protein liên kết kháng nguyên CD27L đã tinh chế bằng các cách khác nhau như bằng cách sử dụng các peptidaza cụ thể để cắt.

Các trình tự tạo suturen có thể là cùng loại (*nghĩa là*, từ cùng loài và/hoặc chủng làm tế bào chủ), khác loại (*nghĩa là*, từ loài khác loài hoặc chủng tế bào chủ), lai (*nghĩa là*, kết hợp các trình tự tạo suturen từ nhiều hơn một nguồn), tổng hợp hoặc tự nhiên. Được hiểu theo cách thông thường, nguồn trình tự tạo suturen có thể là nguồn sinh vật nhân sơ hoặc nguồn sinh vật nhân chuẩn bất kỳ, sinh vật có xương sống hoặc sinh vật không xương sống bất kỳ, hoặc thực vật bất kỳ, miễn là trình tự tạo suturen có chức năng trong, và có thể được hoạt hóa bởi, bộ máy tế bào chủ.

Các trình tự tạo suturen hữu dụng trong các vector theo sáng chế này có thể đạt được theo phương pháp bất kỳ trong số một vài phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể là, các trình tự tạo suturen hữu dụng ở đây sẽ được nhận biết trước bằng cách lập bản đồ và/hoặc bằng cách cắt bởi endonucleaza giới hạn và như vậy có thể được phân lập từ nguồn mô thích hợp bằng cách sử dụng các endonucleaza giới hạn thích hợp. Trong một số trường hợp, trình tự nucleotit đầy đủ của trình tự tạo suturen có thể được biết. Ở đây, trình tự tạo suturen có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây để tổng hợp hoặc tách dòng axit nucleic.

Khi tất cả hoặc chỉ một phần trình tự tạo suturen được biết, nó có thể thu được bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và/hoặc bằng cách sàng lọc thư viện hệ gen với đầu dò thích hợp như oligonucleotit và/hoặc đoạn trình tự tạo suturen từ cùng hoặc khác loài. Khi trình tự tạo suturen không được biết, đoạn ADN chứa trình tự tạo suturen có thể

được phân lập từ đoạn ADN lớn hơn mà có thể chứa, ví dụ, trình tự mã hóa hoặc thậm chí gen hoặc các gen khác. Sự phân lập có thể được thực hiện bằng cách cắt bởi endonucleaza giới hạn để tạo ra đoạn ADN thích hợp sau đó phân lập bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế trên gel agarosa, sắc ký cột Qiagen® (Chatsworth, CA), hoặc các phương pháp khác được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Việc chọn các enzym thích hợp để thực hiện mục đích này sẽ là rõ ràng dễ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Điểm khởi đầu sao chép thường là một phần trong các vector biểu hiện ở tế bào nhân sơ được mua thương mại, và điểm khởi đầu này trợ giúp trong quá trình khuếch đại vector ở tế bào chủ. Nếu vector lựa chọn không chứa vị trí điểm khởi đầu sao chép, một vị trí điểm khởi đầu sao chép có thể được tổng hợp theo cách hóa học dựa trên trình tự đã biết, và được nối vào vector. Ví dụ, điểm khởi đầu sao chép từ plasmit pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) là thích hợp cho hầu hết các vi khuẩn gram âm, và các điểm khởi đầu sao chép khác nhau của virus (*ví dụ*, SV40, polyoma, adenovirus, virus gây bệnh viêm miệng có mụn nước (vesicular stomatitis virus, VSV), hoặc các papillomavirus như HPV hoặc BPV) là hữu dụng để tách dòng các vector ở các tế bào động vật có vú. Nói chung, thành phần điểm khởi đầu sao chép là không cần thiết cho các vector biểu hiện ở động vật có vú (ví dụ, điểm khởi đầu sao chép SV40 thường được sử dụng chỉ do nó cũng chứa trình tự khởi động sớm của virus).

Trình tự kết thúc phiên mã thường nằm ở đầu 3' đối với đầu của vùng mã hóa polypeptit và dùng để kết thúc phiên mã. Thông thường, trình tự kết thúc phiên mã ở các tế bào nhân sơ là đoạn giàu G-C theo sau bằng trình tự poly-T. Trong khi trình tự này được tách dòng dễ dàng từ thư viện hoặc thậm chí được mua thương mại là một phần của vector, nó có thể cũng dễ dàng được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp axit nucleic như các phương pháp được mô tả ở đây.

Gen chỉ thị chọn lọc mã hóa protein cần thiết để sống sót và sinh trưởng của tế bào chủ được phát triển trong môi trường nuôi cấy chọn lọc. Các gen chỉ thị chọn lọc đặc trưng mã hóa các protein mà (a) tạo ra sự kháng các kháng sinh hoặc các chất độc khác, ví dụ, ampicillin, tetracyclin, hoặc kanamycin ở các tế bào chủ nhân sơ; (b) bổ sung các thiếu hụt

về dinh dưỡng thụ động của tế bào; hoặc (c) cung cấp các chất dinh dưỡng thiết yếu không có sẵn từ các môi trường phức hợp hoặc môi trường xác định. Các chỉ thị chọn lọc đặc hiệu là gen kháng kanamycin, gen kháng ampicillin, và gen kháng tetracyclin. Ưu điểm là, gen kháng neomycin có thể cũng được sử dụng để chọn lọc ở cả các tế bào chủ nhân sơ và các tế bào chủ nhân chuẩn.

Các gen chọn lọc khác có thể được sử dụng để khuếch đại gen mà sẽ được biểu hiện. Khuếch đại là quá trình trong đó các gen mà cần cho quá trình sản xuất protein quan trọng cho sự sinh trưởng hoặc sống sót của tế bào được lặp lại cùng nhau trong các nhiễm sắc thể của các thế hệ kế tiếp của các tế bào tái tổ hợp. Các ví dụ về các chỉ thị chọn lọc thích hợp cho các tế bào động vật có vú bao gồm dihydrofolat reductaza (dihydrofolate reductase, DHFR) và các gen thymidin kinaza không có trình tự khởi động. Các thể biến nạp ở tế bào ở động vật có vú được đặt dưới áp lực chọn lọc trong đó chỉ các thể biến nạp là duy nhất thích ứng để sống sót do tác dụng của gen chọn lọc có mặt trong vector. Áp lực chọn lọc bị bắt buộc bằng quá trình nuôi cấy các tế bào được biến nạp ở các điều kiện trong đó nồng độ chất chọn lọc trong môi trường được tăng liên tiếp, bằng cách này dẫn đến khuếch đại cả gen có thể chọn lọc và ADN mã hóa gen khác, như kháng thể protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với polypeptit CD27L. Kết quả là, các lượng polypeptit như protein liên kết kháng nguyên CD27L tổng hợp từ ADN khuếch đại được tăng lên.

Vị trí liên kết ribosom thường là cần thiết cho sự khởi đầu dịch mã của mRNA và được đặc trưng bằng trình tự Shine-Dalgarno (các sinh vật nhân sơ) hoặc trình tự Kozak (các sinh vật nhân chuẩn). Yếu tố này thường nằm ở đầu 3' đối với trình tự khởi động và đầu 5' đối với trình tự mã hóa của polypeptit được biểu hiện. Theo các phương án cụ thể, một hoặc nhiều vùng mã hóa có thể được liên kết hoạt động với vị trí liên kết ribosom nội sinh (internal ribosome binding site IRES), cho phép dịch mã hai khung đọc mở từ bản phiên mã ARN đơn.

Trong một số trường hợp, như trong đó quá trình glycosyl hóa là mong muốn trong hệ biểu hiện ở tế bào chủ nhân chuẩn, người ta có thể thao tác các tiền trình tự hoặc các trình tự chưa trưởng thành để làm tăng quá trình glycosyl hóa hoặc hiệu suất. Ví dụ, người ta có thể thay đổi vị trí phân cắt peptidaza trong peptit tín hiệu cụ thể, hoặc bổ sung các

trình tự chưa trưởng thành, mà cũng có thể ảnh hưởng đến quá trình glycosyl hóa. Sản phẩm protein cuối cùng có thể có, ở vị trí -1 (tương đối so với axit amin đầu tiên của protein trưởng thành) một hoặc nhiều các axit amin bổ sung vốn liên quan đến sự biểu hiện, mà có thể không được loại bỏ hoàn toàn. Ví dụ, sản phẩm protein cuối cùng có thể có một hoặc hai gốc axit amin được tìm thấy ở vị trí peptidaza phân cắt, được gắn với đầu cùng amino. Theo cách khác, sử dụng một số vị trí phân cắt của enzym có thể dẫn đến dạng bị cắt bớt không đáng kể của polypeptit mong muốn, nếu enzym cắt tại vùng như vậy ở polypeptit trưởng thành.

Các vector biểu hiện và nhân dòng theo sáng chế thường sẽ chứa trình tự khởi động mà được nhận biết bằng sinh vật chủ và được liên kết hoạt động với phân tử mã hóa protein liên kết kháng nguyên CD27L. Các trình tự khởi động là các trình tự không được phiên mã nằm phía trên (*nghĩa là*, 5') đối với codon khởi đầu của gen cấu trúc (thường trong khoảng 100 đến 1000 bp) mà kiểm soát quá trình phiên mã của gen cấu trúc. Các trình tự khởi động thường được xếp nhóm vào một trong hai loại: các trình tự khởi động có thể cảm ứng và các trình tự khởi động cơ định. Các trình tự khởi động có thể cảm ứng bắt đầu các mức phiên mã của ADN được tăng dưới sự kiểm soát của chúng khi đáp ứng đối với một số điều kiện nuôi cấy thay đổi, như có hoặc không có chất dinh dưỡng hoặc thay đổi nhiệt độ. Mặt khác, các trình tự khởi động cơ định phiên mã gen theo cách như nhau mà các trình tự khởi động cơ định được liên kết hoạt động với chúng, nghĩa là, kiểm soát ít hoặc không kiểm soát suốt quá trình biểu hiện gen. Số lượng lớn các trình tự khởi động, được nhận biết bởi một loạt các tế bào chủ tiềm năng, là đã biết rõ. Trình tự khởi động thích hợp được liên kết hoạt động với ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ chứa protein liên kết kháng nguyên CD27L theo sáng chế bằng cách loại bỏ trình tự khởi động từ ADN ban đầu bằng cách cắt bởi enzym giới hạn và chèn thêm trình tự khởi động mong muốn vào vector.

Các trình tự khởi động thích hợp để sử dụng ở các tế bào chủ nấm men cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các trình tự tăng cường ở nấm men có lợi thế sử dụng với các trình tự khởi động ở nấm men. Các trình tự khởi động thích hợp để sử dụng ở các tế bào chủ của động vật có vú đã được biết rõ và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các vùng có được từ các hệ gen của các virus như virus polyoma, virus gây bệnh đậu gà,

adenovirut (như Adenovirut 2), virut u nướm bò, virut saccôm ở chim, virut cự bào, các retrovirut, virut viêm gan B và tốt nhất là Virut Simian 40 (Simian Virus, SV40). Các trình tự khởi động thích hợp khác ở động vật có vú bao gồm các trình tự khởi động khác loại ở động vật có vú, ví dụ, các trình tự khởi động sốc nhiệt và trình tự khởi động actin.

Các trình tự khởi động bổ sung có thể quan tâm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: trình tự khởi động sớm của SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); trình tự khởi động của CMV (Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); trình tự khởi động chứa trong đoạn lặp đầu cùng dài đầu 3' của virut saccôm Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); trình tự khởi động thymidin kinaza của virut gây bệnh mụn rộp (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); trình tự khởi động và các trình tự điều hòa từ gen metallothionin (Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); và các trình tự khởi động của sinh vật nhân sơ như trình tự khởi động beta-lactamaza (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); hoặc trình tự khởi động tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Cũng đáng quan tâm là các vùng kiểm soát phiên mã sau đây ở động vật, mà biểu lộ độ đặc hiệu mô và được sử dụng ở động vật biến đổi gen: vùng kiểm soát gen elastaza I mà hoạt động ở các tế bào tuyến nang ở tụy (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); vùng kiểm soát gen insulin mà hoạt động ở các tế bào beta tuyến tụy (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); vùng kiểm soát gen globulin miễn dịch mà hoạt động ở các tế bào bạch huyết (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); vùng kiểm soát virut gây khối u vú ở chuột mà hoạt động ở tinh hoàn, vú, các tế bào dạng bạch huyết và dưỡng bào (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495); vùng kiểm soát gen albumin mà hoạt động ở gan (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); vùng kiểm soát gen của protein alpha-feto hoạt động ở gan (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); vùng kiểm soát gen alpha 1-antitrypsin hoạt động ở gan (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); vùng kiểm soát gen beta-globin hoạt động ở các tế bào dòng tủy (Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-

94); vùng kiểm soát gen của protein bazơ myelin mà hoạt động trong các tế bào thần kinh đệm ít gai ở não (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712); vùng kiểm soát gen của chuỗi nhẹ myosin-2 mà hoạt động ở cơ xương khớp (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); và vùng kiểm soát gen hormon giải phóng gonadotropin hoạt động ở vùng não dưới đồi (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378).

Trình tự tăng cường có thể được chèn thêm vào vector để tăng quá trình phiên mã của ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng chứa protein liên kết kháng nguyên CD27L theo sáng chế bởi các sinh vật nhân chuẩn bậc cao hơn. Các trình tự tăng cường là các yếu tố ADN hoạt động cis, thường có chiều dài khoảng 10-300 bp, hoạt động ở trình tự khởi động để làm tăng quá trình phiên mã. Các trình tự tăng cường có hướng tương đối và vị trí không phụ thuộc, được thấy tại cả các vị trí 5' và 3' đối với đơn vị phiên mã. Một vài trình tự tăng cường có sẵn từ các gen động vật có vú đã được biết (ví dụ, globin, elastaza, albumin, protein alpha-feto và insulin). Tuy nhiên, đặc trưng là, trình tự tăng cường từ virus được sử dụng. Trình tự tăng cường của SV40, trình tự tăng cường của trình tự khởi động sớm ở virus cự bào, trình tự tăng cường ở polyoma, và các trình tự tăng cường ở adenovirus được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là các yếu tố tăng cường làm ví dụ để hoạt hóa các trình tự khởi động của sinh vật nhân chuẩn. Trong khi trình tự tăng cường có thể có vị trí trong vector tại 5' hoặc 3' đối với trình tự mã hóa, cụ thể là nó nằm tại vị trí 5' từ trình tự khởi động. Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu tự nhiên hoặc trình tự tín hiệu khác loại thích hợp (trình tự dẫn hoặc peptit tín hiệu) có thể được kết hợp vào vector biểu hiện, để thúc đẩy kháng thể tiết ngoại bào. Sự lựa chọn peptit tín hiệu hoặc peptit dẫn phụ thuộc vào dạng các tế bào chủ trong đó kháng thể được tạo ra, và trình tự tín hiệu khác loại có thể thay thế trình tự tín hiệu tự nhiên. Các ví dụ về các peptit tín hiệu mà có chức năng ở các tế bào chủ của động vật có vú bao gồm như sau: trình tự tín hiệu đối với interleukin-7 (IL-7) được mô tả trong Patent Mỹ Số 4.965.195; trình tự tín hiệu đối với thụ thể interleukin-2 được mô tả trong Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768; peptit tín hiệu của thụ thể interleukin-4 được mô tả trong Patent EP Số 0367 566; peptit tín hiệu của thụ thể interleukin-1 typ I được mô tả trong Patent Mỹ Số 4.968.607; peptit tín hiệu của thụ thể interleukin-1 typ II được mô tả trong Patent EP Số 0 460 846.

Vector có thể chứa một hoặc nhiều yếu tố để thúc đẩy sự biểu hiện khi vector được hợp nhất vào hệ gen tế bào chủ. Các ví dụ bao gồm yếu tố EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) và vùng gắn chất nền (matrix attachment region, MAR). Các MAR tạo ra tổ chức cấu trúc của chromatin và có thể bảo vệ vector được hợp nhất khỏi ảnh hưởng của “vị trí”. Như vậy, các MAR là đặc biệt hữu dụng khi vector được sử dụng để tạo ra các thể chuyển nạp ổn định. Nhiều axit nucleic chứa MAR tự nhiên và MAR tổng hợp được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, các Patent Mỹ Số 6.239.328; 7.326.567; 6.177.612; 6.388.066; 6.245.974; 7.259.010; 6.037.525; 7.422.874; 7.129.062.

Các vector biểu hiện theo sáng chế có thể được kiến tạo từ vector ban đầu như vector có bán sẵn. Các vector như vậy có thể chứa hoặc không chứa tất cả các trình tự tạo sườn mong muốn. Trong đó một hoặc nhiều trình tự tạo sườn được mô tả ở đây là không tồn tại sẵn trong vector, chúng có thể thu được và được nối riêng biệt vào vector. Các phương pháp sử dụng để thu được mỗi trình tự trong số các trình tự tạo sườn là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sau khi vector được kiến tạo và phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, hoặc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa trình tự liên kết kháng nguyên CD27L được chèn thêm vào vị trí thích hợp của vector, vector hoàn chỉnh có thể được chèn vào tế bào chủ thích hợp để khuếch đại và/hoặc biểu hiện polypeptit. Sự biến nạp của vector biểu hiện protein liên kết kháng nguyên CD27L vào tế bào chủ được chọn có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết rõ bao gồm kỹ thuật chuyển nạp, lây nhiễm, đồng kết tủa canxi phosphat, xung điện, vi tiêm, chuyển gen bằng liposom (lipofection), chuyển nạp được trung gian bởi DEAE-dextran, hoặc các kỹ thuật đã biết khác. Phương pháp được chọn sẽ là một phần chức năng của dạng tế bào chủ được sử dụng. Các phương pháp này và các phương pháp thích hợp khác là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và được trình bày, ví dụ, trong Sambrook *et al.*, 2001, ở trên.

Tế bào chủ, khi được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp, tổng hợp protein liên kết kháng nguyên CD27L mà sau đó có thể được thu từ môi trường nuôi cấy (nếu tế bào chủ tiết nó vào môi trường) hoặc trực tiếp từ tế bào chủ tạo ra nó (nếu nó không được tiết). Việc chọn tế bào chủ thích hợp sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, như các mức biểu

hiện mong muốn, các biến đổi polypeptit mà mong muốn hoặc cần thiết cho hoạt tính (như glycosyl hóa hoặc phosphoryl hóa) và dễ dàng cuộn thành phân tử có hoạt tính sinh học. Tế bào chủ có thể là tế bào chủ nhân chuẩn hoặc tế bào chủ nhân sơ.

Các dòng tế bào ở động vật có vú có sẵn như các dòng tế bào chủ để biểu hiện đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dòng tế bào bất tử có sẵn từ Bảo tàng giống Mỹ (American Type Culture Collection, ATCC) và các dòng tế bào bất kỳ sử dụng ở hệ biểu hiện được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra các polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Nhìn chung, các tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện tái tổ hợp mà bao gồm ADN mã hóa polypeptit kháng thể kháng CD27L mong muốn. Trong số các tế bào chủ có thể được sử dụng là các tế bào của sinh vật nhân sơ, của nấm men hoặc sinh vật nhân chuẩn bậc cao hơn. Các sinh vật nhân sơ bao gồm các sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ *E. coli* hoặc khuẩn que. Các tế bào nhân chuẩn bậc cao hơn bao gồm các tế bào ở côn trùng và các dòng tế bào được thiết lập có nguồn gốc ở động vật có vú. Các ví dụ về các dòng tế bào chủ ở động vật có vú thích hợp bao gồm dòng COS-7 của các tế bào thận khỉ (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), các tế bào L, các tế bào 293, các tế bào C127, các tế bào 3T3 (ATCC CCL 163), các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary, CHO), hoặc các dẫn xuất của chúng như Veggie CHO và các dòng tế bào liên quan mà phát triển trong các môi trường không có huyết thanh (Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), các tế bào HeLa, các dòng tế bào BHK (ATCC CRL 10), và dòng tế bào CVI/EBNA nhận được từ dòng tế bào CVI của thận khỉ xanh châu Phi (ATCC CCL 70) như được mô tả bởi McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821, các tế bào thận phôi người như 293, 293 EBNA hoặc MSR 293, các tế bào biểu bì A431 ở người, các tế bào Colo205 ở người, các dòng tế bào linh trưởng được biến nạp khác, các tế bào lưỡng bội bình thường, các chủng tế bào nhận được từ mô nuôi cấy sơ cấp *in vitro*, các mô cấy sơ cấp, các tế bào HL-60, U937, HaK hoặc Jurkat. Tùy ý, các dòng tế bào ở động vật có vú như HepG2/3B, KB, NIH 3T3 hoặc S49, ví dụ, có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit khi mong muốn sử dụng polypeptit trong các thử nghiệm truyền tín hiệu hoặc chỉ thị khác nhau. Theo cách khác, có thể tạo ra polypeptit trong các sinh vật nhân chuẩn bậc thấp hơn

như nấm men hoặc ở các sinh vật nhân sơ như các vi khuẩn. Các nấm men thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, các chủng *Kluyveromyces*, *Candida*, hoặc chủng nấm men bất kỳ có khả năng biểu hiện các polypeptit khác loại. Các chủng vi khuẩn thích hợp bao gồm *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, hoặc các chủng vi khuẩn bất kỳ có khả năng biểu hiện các polypeptit khác loại. Nếu polypeptit được tạo ra ở nấm men hoặc các vi khuẩn, có thể mong muốn biến đổi polypeptit được tạo ra ở đây, ví dụ bằng quá trình phosphoryl hóa hoặc glycosyl hóa các vị trí thích hợp, để thu được polypeptit chức năng. Các sự gắn cộng hóa trị như vậy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học hoặc các phương pháp hoạt tính enzym đã biết. Polypeptit có thể cũng được tạo ra bằng cách liên kết hoạt động axit nucleic phân lập theo sáng chế với các trình tự kiểm soát thích hợp trong một hoặc nhiều vector biểu hiện ở côn trùng, và sử dụng hệ biểu hiện ở côn trùng. Các nguyên liệu và các phương pháp cho các hệ biểu hiện ở tế bào baculovirus/ côn trùng là có bán sẵn trong dạng kit từ, ví dụ, Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (kit MaxBac®), và các phương pháp như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin Số 1555 (1987), và Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Các hệ dịch mã không có tế bào cũng được sử dụng để tạo ra các polypeptit bằng cách sử dụng các ARN nhận được từ các cấu trúc axit nucleic được bộc lộ ở đây. Các vector biểu hiện và nhân dòng thích hợp để sử dụng với các tế bào chủ của vi khuẩn, nấm, nấm men, và các tế bào chủ động vật có vú được mô tả bởi Pouwels *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985). Tế bào chủ mà bao gồm axit nucleic phân lập theo sáng chế tốt hơn là được liên kết hoạt động với ít nhất một trình tự kiểm soát biểu hiện, là “tế bào chủ tái tổ hợp”.

Theo các phương án cụ thể, các dòng tế bào có thể được chọn qua việc xác định các dòng tế bào nào có các mức biểu hiện cao và sản xuất theo cách cơ định các protein liên kết kháng nguyên có các thuộc tính liên kết CD27L. Theo phương án khác, dòng tế bào từ dòng tế bào B mà không tạo ra kháng thể của nó nhưng có khả năng tạo ra và tiết kháng thể khác loại có thể được chọn.

Các thể cộng hợp thuốc - kháng thể

Các phương án theo sáng chế bao gồm các thể cộng hợp thuốc - kháng thể (antibody drug conjugates, ADCs). Nói chung ADC bao gồm kháng thể được cộng hợp với chất hóa trị liệu, ví dụ, chất gây độc tế bào, chất kìm hãm tế bào sinh trưởng và phân chia, độc tố, hoặc chất phóng xạ. Phân tử cầu nối có thể được sử dụng để cộng hợp thuốc với kháng thể. Hàng loạt các cầu nối và các thuốc hữu dụng trong kỹ thuật ADC đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng theo các phương án theo sáng chế này. (Tham khảo US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; và 6340701, tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các thể cộng hợp thuốc - kháng thể có thể được điều chế bằng các phương pháp in vitro. Để liên kết thuốc hoặc tiền thuốc với kháng thể, nhóm liên kết được sử dụng. Các nhóm liên kết thích hợp là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các nhóm disunfua, các nhóm không bền với axit, các nhóm không bền với ánh sáng, các nhóm không bền với peptidaza, và các nhóm không bền với esteraza. Các nhóm liên kết được ưu tiên là các nhóm disunfua. Ví dụ, các thể cộng hợp có thể được kiến tạo bằng cách sử dụng phản ứng trao đổi disunfua giữa kháng thể và thuốc hoặc tiền thuốc. Các phân tử thuốc cũng có thể được liên kết với chất liên kết tế bào qua phân tử mang trung gian như albumin huyết thanh.

Theo các phương án cụ thể, chất liên kết tế bào được biến đổi bằng cách cho chất phản ứng liên kết chéo hai chức năng phản ứng với chất liên kết tế bào, bằng cách này tạo ra sự liên kết cộng hóa trị của phân tử cầu nối với chất liên kết tế bào. Như được sử dụng ở đây, "chất phản ứng liên kết chéo hai chức năng" hoặc "cầu nối" là nhóm chức hóa học bất kỳ mà liên kết cộng hóa trị chất liên kết tế bào với thuốc, như các thuốc được mô tả ở đây. Theo phương án cụ thể của sáng chế, một phần của gốc liên kết được cung cấp bởi thuốc. Về điểm này, thuốc bao gồm gốc liên kết là một phần của phân tử cầu nối lớn hơn mà được sử dụng để nối chất liên kết tế bào với thuốc. Ví dụ, để tạo ra maytansinoit DM1, mạch bên tại nhóm hydroxyl C-3 của maytansin được biến đổi để có nhóm sulfhydryl (sulfhydryl SH) tự do. Dạng được thiol hóa (thiolated) của maytansin có thể phản ứng với chất liên kết tế bào được biến đổi để tạo ra thể cộng hợp. Do vậy, cầu nối cuối cùng được

tập hợp từ hai thành phần, một trong số đó được cung cấp bởi chất phản ứng liên kết chéo, trong khi thành phần còn lại được cung cấp bởi mạch bên của DM1.

Chất phản ứng liên kết chéo hai chức năng thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong mối liên quan đến sáng chế, miễn là chất phản ứng cầu nối cung cấp sự lưu giữ các đặc tính chữa bệnh, ví dụ, tính gây độc tế bào, và các đặc tính nhắm đích của thuốc và chất liên kết tế bào, tương ứng. Theo cách ưu tiên, phân tử cầu nối nối thuốc với chất liên kết tế bào qua các liên kết hóa học (như được mô tả trên đây), sao cho thuốc và chất liên kết tế bào được kết hợp theo cách hóa học (ví dụ, liên kết theo cách cộng hóa trị) với nhau.

Các cầu nối

Theo các phương án cụ thể, ADC chứa cầu nối được tạo bởi một hoặc nhiều thành phần nối. Theo cách ưu tiên, thuốc được nối với chất liên kết tế bào qua liên kết disulfua. Phân tử cầu nối chứa nhóm phản ứng hóa học mà có thể phản ứng với chất liên kết tế bào. Các nhóm phản ứng hóa học được ưu tiên để phản ứng với chất liên kết tế bào là các este N-succinimidyl và các este N-sulfosuccinimidyl. Ngoài ra, phân tử cầu nối chứa nhóm phản ứng hóa học, tốt hơn là nhóm dithiopyridyl, mà có thể phản ứng với thuốc để tạo ra liên kết disulfua. Các phân tử cầu nối làm ví dụ bao gồm, ví dụ, N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, SPDP) (tham khảo, ví dụ, Carlsson et al., Biochem. J., 173, 723-737 (1978)), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoat (N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate, SPDB) (tham khảo, ví dụ, Patent Mỹ Số 4.563.304) và N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoat (N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate, SPP) (tham khảo, ví dụ, số Đăng ký CAS 341498-08-6). Các thành phần cầu nối bổ sung làm ví dụ bao gồm 6-maleimidocaproyl, maleimidopropanoyl, valin-xitruin, alanin-phenylalanin, p-aminobenzyloxycarbonyl, và các thành phần là kết quả cộng hợp với các chất phản ứng cầu nối, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, N-succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoat (“N-succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoate, SPP”), N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1 cacboxylat (“N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1 cacboxylate, SMCC,” cũng được chỉ ở đây cũng là “MCC”), và N-succinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoat (“N-succinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoate, SIAB”).

Các cầu nối có thể là cầu nối “phân cắt được” hoặc cầu nối “không phân cắt được” (Ducry and Stump, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 5-13; toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các cầu nối có thể cắt được thiết kế để giải phóng thuốc khi chịu các yếu tố môi trường nhất định, ví dụ, khi nội bào hóa vào tế bào đích. Các cầu nối có thể cắt được bao gồm các cầu nối không bền với axit, các cầu nối nhạy với proteaza, các cầu nối không bền với ánh sáng, cầu nối dimetyl hoặc các cầu nối chứa disulfua. Các cầu nối không phân cắt được có khuynh hướng giữ nguyên liên kết cộng hóa trị với ít nhất một axit amin của kháng thể và thuốc trong khi nội bào hóa bởi tế bào đích và phân hủy trong tế bào đích. Cầu nối không phân cắt được là gốc hóa học bất kỳ mà có khả năng liên kết thuốc, như maytansinoid (ví dụ, DM1, và tương tự), taxan, hoặc chất tương tự CC-1065, với chất liên kết tế bào theo cách cộng hóa trị bền vững. Như vậy, các cầu nối không phân cắt được về cơ bản kháng sự phân cắt tạo ra do axit, sự phân cắt tạo ra do ánh sáng, sự phân cắt tạo ra do peptidaza, sự phân cắt tạo ra do esteraza, và sự phân cắt liên kết disulfua, tại các điều kiện mà trong đó thuốc hoặc chất liên kết tế bào còn hoạt tính.

Các chất phản ứng liên kết chéo thích hợp mà tạo ra các cầu nối không phân cắt được giữa thuốc và chất liên kết tế bào đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về các cầu nối không phân cắt được bao gồm các cầu nối có nhóm chức N-succinimidyl este hoặc N-sulfosuccinimidyl để phản ứng với chất liên kết tế bào, cũng như nhóm chức maleimido- hoặc nhóm chức dựa trên haloaxetyl để với phản ứng với thuốc. Các chất phản ứng cầu nối liên kết chéo chứa nhóm chức dựa trên maleimido bao gồm N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylat (N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate, SMCC), N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxy-(6-amidocaproate), mà là chất tương tự "chuỗi dài" của SMCC (long chain--N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate LC--SMCC), x-maleimidoundecanoic axit N-succinimidyl este (x-maleimidoundecanoic acid N-succinimidyl ester, KMUA), N-succinimidyl este của axit .gamma.-maleimidobutyric (gamma.-maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester, GMBS), N-hydroxysuccinimide este của axit .epsilon.-maleimidocaproic (epsilon.-maleimidocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester, EMCS), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide este (m-

maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MBS), N-(.alpha.-maleimidoacetoxymethyl)-succinimide ester (N-(.alpha.-maleimidoacetoxymethyl)-succinimide ester, AMAS), succinimidyl-6-(.beta.-maleimidopropionamido)hexanoate (succinimidyl-6-(.beta.-maleimidopropionamido)hexanoate, SMPH), N-succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)-butyrate (N-succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)-butyrate, SMPB), và N-(p-maleimidophenyl)isocyanate (N-(p-maleimidophenyl)isocyanate, PMPI). Các chất phản ứng liên kết chéo chứa nhóm chức dựa trên haloacetyl bao gồm N-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoate (N-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoate, SIAB), N-succinimidyl iodoacetate (N-succinimidyl iodoacetate, SIA), N-succinimidyl bromoacetate (N-succinimidyl bromoacetate, SBA), và N-succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate (N-succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate, SBAP). Cầu nối không phân cắt được được ưu tiên làm ví dụ là MCC.

Các cầu nối chất phản ứng liên kết chéo khác không có nguyên tử lưu huỳnh mà tạo ra các cầu nối không phân cắt được có thể cũng được sử dụng theo phương pháp của sáng chế. Các cầu nối như vậy có thể nhận được từ các gốc nền axit dicarboxylic. Các gốc nền axit dicarboxylic thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các axit alpha, omega-dicarboxylic có công thức chung (IX):



trong đó X là nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 2 đến 20 nguyên tử cacbon, Y là nhóm xycloalkyl hoặc xycloalkenyl có 3 đến 10 nguyên tử cacbon, Z là nhóm thơm được thế hoặc không được thế có 6 đến 10 nguyên tử cacbon, hoặc nhóm heterocyclic được thế hoặc không được thế trong đó nguyên tử khác loại được chọn từ N, O hoặc S, và trong đó mỗi l, m, và n là 0 hoặc 1, miễn là l, m, và n tất cả không là zero tại cùng thời điểm.

Nhiều cầu nối trong số các cầu nối không phân cắt được bộc lộ ở đây được mô tả chi tiết trong Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0169933 A1.

Các ví dụ về các cầu nối phân cắt được thích hợp bao gồm các cầu nối disunfua, các cầu nối không bền với axit, các cầu nối không bền với ánh sáng, các cầu nối không bền với peptidaza, và các cầu nối không bền với esteraza. Các cầu nối chứa disunfua là các cầu nối phân cắt được qua trao đổi disunfua, có thể xuất hiện trong các điều kiện sinh lý. Các cầu nối không bền với axit là các cầu nối phân cắt được tại độ pH axit. Ví dụ, các ngăn nội bào nhất định, như các hạt cơ quan nội bào và các lysosom, có độ pH axit (pH 4-5), và cung cấp các điều kiện thích hợp để cắt các cầu nối không bền với axit. Các cầu nối không bền với ánh sáng là hữu dụng tại bề mặt cơ thể và trong nhiều khoang cơ thể mà có thể tiếp cận được với ánh sáng. Hơn nữa, ánh sáng hồng ngoại có thể xuyên qua mô. Các cầu nối không bền với peptidaza có thể được sử dụng để cắt các peptit nhất định trong hoặc ngoài các tế bào (tham khảo ví dụ, Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 626-629 (1982), và Umemoto et al., Int. J. Cancer, 43, 677-684 (1989)).

Các loại thuốc

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được cộng hợp với chất hóa trị liệu. Các ví dụ về các chất hóa trị liệu bao gồm các chất phản ứng alkyl, như thiotepa và xyclophosphamit (CYTOXAN.TM.); các alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin, như benzodopa, cacboquon, meturedopa, và uredopa; các etylenimin và các metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoamit, trietylenthiophosphaoramit và trimetylolomelamin; các axetogenin (đặc biệt là bullataxin và bullataxinon); camptothecin (bao gồm chất tổng hợp tương tự topotecan); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm adozelesin của nó, các chất tổng hợp tương tự carzelesin và bizelesin); các cryptophyxin (cụ thể là cryptophyxin 1 và cryptophyxin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm các chất tổng hợp tương tự, KW-2189 và CBI-TMI); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; các mù tạc nitơ như clorambuxil, clomaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamid, mecloretamin, mecloretamin oxit hydroclorid, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, mù tạc uraxil; các nitrosurea như carmustin, clorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các kháng sinh, như các kháng sinh enediyn (ví dụ calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin .gamma.1 và calicheamixin theta I, tham khảo, ví

dụ, Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dynemixin, bao gồm dynemixin A; esperamixin; cũng như chất màu neocarzinostatin và các chất kháng sinh mang màu liên quan chromoprotein enediyn), các aclaxinomysin, actinomycin, anthramycin, azaserin, các bleomycin, cactinomycin, carabixin, caminomycin, carzinophilin; các chromomycin, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubicin (bao gồm morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrolino-doxorubicin và deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, các nitomycin, axit mycophenolic, nogalamycin, các olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozoxin, tubexidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; các chất kháng chất chuyển hóa, như metotrexat và 5-flouraxil (5-fluorouracil, 5-FU); các chất tương tự axit folic, như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin, như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như, anxitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin, 5-FU; các androgen, như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; các thuốc kháng tuyến thượng thận, như aminoglutetimit, mitotan, trilostan; chất độn axit folic, như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziqon; elfomithin; elliptinium axetat; epothilon; etoglucit; gallium nitrat; hydroxyurea; lentinan; lonidamin; các maytansinoit, như maytansin và các ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubicin; axit podophyllinic; 2-ethylhydrazit; procarbazine; PSK.RTM.; razoxan; rhizoxin; sizofuran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziqon; 2,2',2''-trichlorotrietylamin; các trichothexen (đặc biệt là độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidin); urethan; vindesin; dacarbazine; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosid ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; các taxoid, ví dụ paclitaxel (TAXOL.TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) và doxetaxel (TAXOTERE.RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambuxil; gemxitabin; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các chất tương tự bạch kim như xisplatin và cacboplatin; vinblastin; bạch kim; etoposid (VP-16); ifosfamid; mitomycin C;

mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposid; daunomyxin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylomithin (DMFO); axit retinoic; capexitabin; và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dụng của chất bất kỳ trong số các chất trên đây. Cũng được bao gồm trong định nghĩa này là các chất kháng hormon mà hoạt động điều hòa hoặc ức chế hoạt động hormon ở các khối u, như các chất kháng estrogen bao gồm ví dụ tamoxifen, raloxifen, 4(5)-imidazol ức chế aromataza, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và toremifen (Fareston); và các chất kháng androgen, như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolid, và goserelin; siARN và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dụng của chất bất kỳ trong số các chất trên đây. Các chất hóa trị liệu khác có thể được sử dụng theo sáng chế này được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20080171040 hoặc Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ Số 20080305044 và toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Dự tính là kháng thể có thể được cộng hợp với hai hoặc nhiều chất hóa trị liệu khác nhau hoặc được phẩm có thể bao gồm hỗn hợp của các kháng thể trong đó thành phần kháng thể là giống hệt ngoại trừ được cộng hợp với chất hóa trị liệu khác nhau. Các phương án như vậy có thể là hữu dụng để nhắm đích nhiều con đường sinh học ở tế bào đích.

Theo các phương án ưu tiên, ADC bao gồm kháng thể được cộng hợp với một hoặc nhiều phân tử maytansinoit, chúng là các chất ức chế quá trình phân bào nguyên phân mà hoạt động bằng cách ức chế quá trình polyme hóa tubulin. Các maytansinoit, bao gồm các biến đổi khác nhau, được mô tả trong các Patent Mỹ Số 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; và WO 2009/099728. Các gốc thuốc maytansinoit có thể được phân lập từ các nguồn tự nhiên, được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, hoặc được điều chế tổng hợp. Các maytansinoit làm ví dụ bao gồm C-19-decloro (Patent Mỹ Số 4256746), C-20-hydroxy (hoặc C-20-demetyl) +/- C-19-decloro (các Patent Mỹ Số 4307016 và 4361650), C-20-demetoxy (hoặc C-20-axyloxy (-OCOR), +/- decrolo (Patent Mỹ Số 4294757), C-9-SH (Patent Mỹ Số 4.424.219), C-14-alkoxymetyl (demetoxy/CH₂OR) (Patent Mỹ Số

4.331.598), C-14-hydroxymethyl hoặc axyloxymethyl (CH_2OH hoặc CH_2OAc) (Patent Mỹ Số 4.450.254), C-15-hydroxy/axyloxy (Patent Mỹ Số 4.364.866), C-15-metoxyl (các Patent Mỹ Số 4.313.946 và 4.315.929), C-18-N-demethyl (các Patent Mỹ Số 4.362.663 và 4.322.348), và 4,5-deoxy (Patent Mỹ Số 4.371.533).

Các vị trí khác nhau ở các hợp chất maytansinoit có thể được sử dụng như vị trí liên kết, phụ thuộc dạng liên kết mong muốn. Ví dụ, để tạo liên kết este, vị trí C-3 có nhóm hydroxyl, vị trí C-14 được biến đổi với hydroxymethyl, vị trí C-15 được biến đổi với nhóm hydroxyl, và vị trí C-20 có nhóm hydroxyl, tất cả là thích hợp (các Patent Mỹ Số 5208020, RE39151, và 6913748; các Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ Số 20060167245 và 20070037972, và Công bố đơn Quốc tế số WO 2009099728).

Các maytansinoit ưu tiên bao gồm các maytansinoit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như DM1, DM3, và DM4 (các Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ Số 2009030924 và 20050276812, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các ADC chứa các maytansinoit, các phương pháp tạo ra các ADC như vậy, và sử dụng các đặc tính chữa bệnh của chúng được bộc lộ trong các Patent Mỹ Số 5208020 và 5416064, Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ Số 20050276812, và Công bố đơn Quốc tế số WO 2009099728 (tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các cầu nối hữu dụng để tạo ra các ADC maytansinoit là được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Patent Mỹ Số 5208020 và các Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ Số 2005016993 và 20090274713; tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các ADC maytansinoit chứa cầu nối SMCC có thể điều chế như được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ Số 2005/0276812.

Theo các phương án cụ thể, ADC chứa kháng thể được cộng hợp với DM1 với cầu nối SMCC. Các phương án được ưu tiên bao gồm Ab1-SMCC-DM1, Ab2-SMCC-DM1, Ab3-SMCC-DM1, Ab4-SMCC-DM1, Ab5-SMCC-DM1, Ab6-SMCC-DM1, Ab7-SMCC-DM1, và Ab8-SMCC-DM1.

Nạp Thuốc

ADC có thể có từ 1 đến 20 chất hóa trị liệu trên một kháng thể. Các chế phẩm ADC có thể được đặc trưng bởi số lượng trung bình các gốc thuốc trên một phân tử kháng thể

trong chế phẩm. Số các gốc thuốc trung bình có thể được xác định bằng các cách thông thường như khối phổ, thử nghiệm miễn dịch, và HPLC. Theo một số trường hợp, tập hợp ADC đồng nhất có thể được phân tách và được tinh chế bằng các cách HPLC pha đảo hoặc điện di. Như vậy, các dược phẩm ADC có thể chứa tập hợp các kháng thể không đồng nhất hoặc đồng nhất được liên kết với 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 gốc thuốc hoặc nhiều hơn.

Theo các phương án ưu tiên, ADC bao gồm là kháng thể được cộng hợp với một hoặc nhiều phân tử DM1. Các phương án theo sáng chế bao gồm các chế phẩm chứa trung bình khoảng 1, khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, khoảng 8, khoảng 9, khoảng 10, khoảng 11, khoảng 12, khoảng 13, khoảng 14, khoảng 15, khoảng 16, khoảng 17, khoảng 18, khoảng 19, hoặc khoảng 20 phân tử DM1 trên một kháng thể. Các chế phẩm ADC được ưu tiên là các chế phẩm chứa Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, hoặc Ab8 có trung bình là từ 1 đến 10 phân tử DM1 trên một kháng thể, các chế phẩm chứa các kháng thể có trung bình là từ 3 đến 7 phân tử DM1 trên một kháng thể, và các chế phẩm chứa các kháng thể có trung bình là từ 4 đến 6 phân tử DM1, bao gồm trung bình là khoảng 4,0, khoảng 4,1, khoảng 4,2, khoảng 4,3, khoảng 4,4, khoảng 4,5, khoảng 4,6, khoảng 4,7, khoảng 4,8, khoảng 4,9, khoảng 5,0, khoảng 5,1, khoảng 5,2, khoảng 5,3, khoảng 5,4, khoảng 5,5, khoảng 5,6, khoảng 5,7, khoảng 5,8, khoảng 5,9 và khoảng 6,0 phân tử DM1 trên một kháng thể.

Các kháng thể có chức năng yếu tố tác động được tăng cường

Một trong số các chức năng của phần Fc trong kháng thể là liên lạc với hệ miễn dịch khi kháng thể liên kết đích của nó. Điều này được xem như “chức năng yếu tố tác động.” Việc liên lạc dẫn đến Tính Gây độc Tế bào Phụ thuộc Kháng thể (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity, ADCC), Hiện tượng Thực bào Tế bào Phụ thuộc Kháng thể (Antibody Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP), và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc phần bổ sung (complement dependent cytotoxicity, CDC). ADCC và ADCP được điều hòa qua liên kết của Fc với các thụ thể Fc trên bề mặt các tế bào hệ miễn dịch. CDC được điều hòa qua liên kết của Fc với các protein của hệ bổ sung, ví dụ, C1q.

Các lớp phụ của IgG khác nhau ở khả năng điều hòa các chức năng yếu tố tác động của chúng. Ví dụ IgG1 có chức năng cao hơn nhiều so với IgG2 và IgG4 trong việc trung gian cho ADCC và CDC. Như vậy, theo các phương án trong đó tế bào biểu hiện CD27L là đích để phá hủy, kháng thể IgG1 kháng CD27L được ưu tiên.

Chức năng yếu tố tác động của kháng thể có thể được tăng, hoặc bị giảm, bằng cách đưa một hoặc nhiều đột biến vào Fc. Các phương án theo sáng chế bao gồm các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, các kháng thể, có Fc được biến đổi để tăng chức năng yếu tố tác động (U.S. 7,317,091 và Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009; cả hai tài liệu toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các phân tử Fc của IgG1 làm ví dụ có chức năng yếu tố tác động được tăng bao gồm (dựa trên hệ đánh số Kabat) các phân tử có các axit amin thể như sau: S239D/I332E

S239D/A330S/I332E

S239D/A330L/I332E

S298A/D333A/K334A

P247I/A339D

P247I/A339Q

D280H/K290S

D280H/K290S/S298D

D280H/K290S/S298V

F243L/R292P/Y300L

F243L/R292P/Y300L/P396L

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L

G236A/S239D/I332E

K326A/E333A

K326W/E333S

K290E/S298G/T299A

K290N/S298G/T299A

K290E/S298G/T299A/K326E

K290N/S298G/T299A/K326E

Các phương án khác theo sáng chế bao gồm các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, các kháng thể, có Fc được biến đổi để giảm chức năng yếu tố tác động. Các phân tử Fc làm ví dụ có chức năng yếu tố tác động bị giảm bao gồm (dựa trên hệ đánh số Kabat) các phân tử có các axit amin thế như sau:

N297A (IgG1)

L234A/L235A (IgG1)

V234A/G237A (IgG2)

L235A/G237A/E318A (IgG4)

H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)

C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)

C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)

L234F/L235E/P331S (IgG1)

S267E/L328F (IgG1)

Phương pháp khác làm tăng chức năng yếu tố tác động của các protein chứa Fc của IgG là bằng cách giảm fucosyl hóa của Fc. Sự loại bỏ lõi fucosa từ các oligosacarit dạng phức có hai nhánh được gắn với Fc làm nâng cao chức năng yếu tố tác động của ADCC mà không thay đổi liên kết kháng nguyên hoặc chức năng yếu tố tác động của CDC. Một vài cách được biết để làm giảm hoặc hủy bỏ fucosyl hóa của các phân tử chứa Fc, ví dụ, các kháng thể. Các cách này bao gồm biểu hiện tái tổ hợp trong các dòng tế bào nhất định ở động vật có vú bao gồm dòng tế bào bị bất hoạt FUT8, dòng CHO biến đổi Lec13, dòng tế bào lai YB2/0 ở chuột, dòng tế bào chứa ARN nhỏ can thiệp đặc hiệu kháng gen FUT8, và dòng tế bào đồng biểu hiện β -1,4-*N*-axetylglucosaminyltransferaza III và Golgi α -

mannosidaza II. Theo cách khác, phân tử chứa Fc có thể được biểu hiện ở tế bào không phải của động vật có vú như tế bào thực vật, nấm men, hoặc tế bào nhân sơ, ví dụ, E. coli. Như vậy, theo các phương án cụ thể của sáng chế, chế phẩm bao gồm kháng thể, ví dụ, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, hoặc Ab8, có fucosyl hóa bị giảm hoặc hoàn toàn không có fucosyl hóa.

Các dược phẩm

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cùng với các chất pha loãng, chất mang, chất hòa tan, chất tạo nhũ hóa, chất bảo quản, và/hoặc tá dược có hiệu quả dược dụng. Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể, bao gồm kháng thể được cộng hợp với thuốc hoặc kháng thể đặc hiệu kép. Các dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chế phẩm lỏng, đông lạnh, và được đông khô.

Ưu tiên hơn là, các nguyên liệu của chế phẩm không độc đối với người dùng tại các liều lượng và các nồng độ được sử dụng. Theo các phương án cụ thể, các dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết kháng nguyên CD27L, ví dụ, ADC liên kết CD27L, được cung cấp.

Theo các phương án cụ thể, dược phẩm có thể chứa các nguyên liệu của chế phẩm để biến đổi, duy trì hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, tính thẩm thấu, tính nhớt, độ trong, màu sắc, tính đẳng trương, mùi, tính vô trùng, độ ổn định, tốc độ phân hủy hoặc giải phóng, hút bám hoặc tính thấm của chế phẩm. Theo các phương án như vậy, các nguyên liệu thích hợp của chế phẩm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, arginin, prolin, hoặc lysin); các chất kháng khuẩn; các chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sulfit hoặc natri hydro-sulfit); các đệm (như borat, bicarbonat, Tris-HCl, các xitrat, các phosphat hoặc các axit hữu cơ khác); các chất đệm (như mannitol hoặc glyxin); các chất tạo cang (như axit etylendiamin tetraaxetic (ethylenediamine tetraacetic acid EDTA); các chất phản ứng phức (như cafein, polyvinylpyrrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin); các chất làm đầy; các monosacarit;

các disacarit; và các cacbohydrat khác (như glucoza, mannoza hoặc các dextrin); các protein (như albumin huyết thanh, gelatin hoặc các globulin miễn dịch); các chất có màu, các chất có vị và các chất pha loãng; các chất nhũ tương hóa; các polyme ưa nước (như polyvinylpyrrolidon); các polypeptit khối lượng phân tử thấp; các ion liên kết với ion tích điện trái dấu với nó trong dung dịch tạo ra muối (như natri); các các chất bảo quản (như benzalkonium clorua, axit benzoic, axit salixylic, timerosal, rượu phenetyl, metylparaben, propylparaben, clorhexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit); các dung môi (như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol); các đường rượu (như mannitol hoặc sorbitol); các chất tạo hỗn dịch; các chất có hoạt tính bề mặt hoặc các chất làm ướt (như các pluronic, PEG, các sorbitan este, các polysorbat như polysorbat 20, polysorbat, triton, trometamin, lexitin, cholesterol, tyloxapal); các chất tăng cường độ ổn định (như sucroza hoặc sorbitol); các chất tăng cường tương lực (như các hợp chất hóa học chứa halogen kim loại kiềm, tốt hơn là natri hoặc kali clorua, mannitol sorbitol); chất dẫn phân phối; các chất pha loãng; các tá dược và/hoặc chất bổ trợ dược phẩm. Tham khảo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Theo các phương án cụ thể, dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này phụ thuộc, ví dụ, đường dự định sử dụng, dạng phân phát và liều lượng mong muốn. Tham khảo, ví dụ, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, ở trên. Theo các phương án cụ thể, các chế phẩm như vậy có thể ảnh hưởng đến trạng thái cơ thể, độ ổn định, tốc độ giải phóng in vivo và tốc độ thanh thải in vivo của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, chất dẫn hoặc chất mang chủ yếu trong dược phẩm có thể có bản chất là nước hoặc không là nước. Ví dụ, chất dẫn hoặc chất mang thích hợp có thể là nước để tiêm, dung dịch muối sinh lý hoặc dịch não tủy nhân tạo, có thể được bổ sung với các nguyên liệu khác thường có trong các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa. Dung dịch đệm muối trung tính hoặc dung dịch muối được trộn với albumin huyết thanh là các chất dẫn làm ví dụ khác. Theo các phương án cụ thể, các dược phẩm bao gồm đệm Tris có độ pH khoảng 7,0-8,5, hoặc đệm axetat có độ pH khoảng 4,0-5,5, và có thể bao gồm thêm sorbitol hoặc

đệm thể thích hợp cho nó. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L có thể được điều chế để bảo quản bằng cách trộn chế phẩm được chọn có độ tinh khiết mong muốn với các chất tùy ý trong chế phẩm (REMITINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, ở trên) ở dạng bánh được đông khô hoặc dạng dung dịch nước. Hơn nữa, theo các phương án cụ thể, sản phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L có thể được tạo ra dưới dạng sản phẩm đông khô bằng cách sử dụng các tá dược thích hợp như sucroza.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được chọn để phân phối ngoài đường tiêu hóa. Theo cách khác, các chế phẩm có thể được chọn để hít hoặc để phân phối qua đường tiêu hóa, như đường miệng. Việc bào chế các chế phẩm được dụng như vậy là nằm trong phạm vi của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thành phần chế phẩm tồn tại tốt hơn ở các nồng độ mà có thể chấp nhận được đối với vị trí dùng. Theo các phương án cụ thể, các đệm được sử dụng để duy trì chế phẩm tại độ pH sinh lý hoặc tại độ pH thấp hơn không đáng kể, cụ thể là trong phạm vi độ pH từ khoảng 5 đến khoảng 8.

Khi dự tính dùng ngoài đường tiêu hóa, các chế phẩm chữa bệnh sử dụng theo sáng chế này có thể được đề xuất ở dạng không có pyrogen, dung dịch nước có thể chấp nhận được ngoài đường tiêu hóa chứa protein liên kết kháng nguyên CD27L mong muốn trong chất dẫn được dụng. Chất dẫn thích hợp cụ thể để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước cất vô trùng trong đó protein liên kết kháng nguyên CD27L được tạo ra như dung dịch đẳng trương vô trùng, được bảo quản thích hợp. Theo các phương án cụ thể, dạng bào chế có thể gồm chế phẩm có phân tử mong muốn với chất, như các vi cầu có thể tiêm, các hạt có thể bị ăn mòn sinh học, các hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), các hạt hoặc các liposom, mà có thể cung cấp sự giải phóng được kiểm soát hoặc sự giải phóng bền vững của sản phẩm mà có thể được phân phối qua tiêm liều lớn dự trữ. Theo các phương án cụ thể, axit hyaluronic có thể cũng được sử dụng, có ảnh hưởng thúc đẩy sự tồn tại bền vững ở hệ tuần hoàn. Theo các phương án cụ thể, các dụng cụ phân phối thuốc có thể cấy ghép có thể được sử dụng để đưa vào protein liên kết kháng nguyên mong muốn.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra để hít. Theo các phương án này, các protein liên kết kháng nguyên CD27L có lợi thể được điều chế như bột khô, có thể hít được. Theo các phương án cụ thể, các dung dịch hít của protein liên kết kháng nguyên CD27L có thể cũng được tạo ra với chất đẩy để phân phối ở dạng bình phun. Theo các phương án cụ thể, các dung dịch có thể được tạo khí dung. Vì vậy, việc dùng theo đường phổi và các phương pháp bào chế được mô tả thêm trong Đơn yêu cầu cấp Patent Quốc tế Số PCT/US94/001875, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và mô tả cách phân phối theo đường phổi của các protein được biến đổi theo cách hóa học.

Cũng được dự tính còn là các chế phẩm có thể được dùng theo đường miệng. Các protein liên kết kháng nguyên CD27L được dùng theo cách này có thể được tạo ra cùng hoặc không cùng các chất mang thường được sử dụng trong việc pha trộn các dạng liều lượng rắn như các viên nén và các viên nang. Theo các phương án cụ thể, viên nang có thể được thiết kế để giải phóng phần hoạt tính của chế phẩm tại vị trí trong đường tiêu hóa khi khả dụng sinh học được tối đa hóa và phân hủy tiền toàn thân được tối thiểu hóa. Các chất bổ sung có thể được bao gồm để tạo thuận lợi cho sự hấp thụ của protein liên kết kháng nguyên CD27L. Các chất pha loãng, các chất tạo mùi, các sáp có nhiệt độ nóng chảy thấp, các dầu thực vật, các chất bôi trơn, các chất tạo hỗn dịch, các chất gây ra viên nén, và các chất liên kết có thể cũng được sử dụng.

Các dược phẩm bổ sung sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các chế phẩm liên quan đến các protein liên kết kháng nguyên CD27L trong các chế phẩm phân phối bền vững hoặc được kiểm soát. Các kỹ thuật để tạo ra một loạt các cách phân phối bền vững hoặc được kiểm soát khác, như các chất mang liposom, các vi hạt có thể bị ăn mòn sinh học hoặc các hạt có lỗ và tiêm liều dự trữ lớn, là cũng được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, ví dụ, Đơn yêu cầu cấp Patent Quốc tế Số PCT/US93/00829, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và mô tả sự giải phóng được kiểm soát của các vi hạt polyme có lỗ để phân phối các dược phẩm. Các chế phẩm giải phóng bền vững có thể bao gồm các chất nền polyme bán thấm ở dạng các vật phẩm được tạo hình dạng, ví dụ, bao phim, hoặc các vi nang. Các chất nền giải phóng bền vững có thể bao gồm các polyeste, các hydrogel,

các polylactid (như được bộc lộ trong Patent Mỹ Số 3.773.919 và Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Châu Âu Số EP 058481, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), các đồng polyme của L-axit glutamic và gama etyl-L-glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poly (2-hydroxyetyl-metacrylat) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etylen vinyl axetat (Langer et al., 1981, ở trên) hoặc poly-D(-)-3-hydroxybutyric axit (Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Châu Âu Số EP 133.988). Các chế phẩm giải phóng bền vững có thể cũng bao gồm các liposom mà có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ trong số một vài phương pháp được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, ví dụ, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; các Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent châu Âu Số EP 036.676; EP 088.046 và EP 143.949, được đưa vào bằng cách viện dẫn.

Các dược phẩm sử dụng cho đường dùng in vivo được cung cấp thông thường dưới dạng các chế phẩm vô trùng. Sự vô trùng có thể được thực hiện bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng. Khi chế phẩm được đông khô, sự vô trùng bằng cách sử dụng phương pháp này có thể được thực hiện trước hoặc sau quá trình đông khô và hoàn nguyên. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản trong dạng đông khô hoặc dạng dung dịch. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa nói chung được đặt vào vật chứa có cửa tiếp cận vô trùng, ví dụ, túi dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút có thể xuyên qua bằng kim tiêm dưới da.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L tự tạo đậm, mà có thể được sử dụng như các dược phẩm, như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent quốc tế WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), mà toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Như được thảo luận trên đây, các phương án cụ thể đề xuất các chế phẩm protein của các liên kết kháng nguyên CD27L, cụ thể là các dược phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L, mà bao gồm, ngoài protein liên kết kháng nguyên CD27L, một hoặc nhiều tá dược như các tá dược được mô tả theo cách minh họa trong phần này và chỗ khác ở đây. Các tá dược có thể được sử dụng trong sáng chế liên quan đến nhiều mục đích khác nhau,

như điều chỉnh các tính chất vật lý, hóa học, hoặc sinh học của các chế phẩm, như điều chỉnh tính nhớt, và hoặc các quá trình theo sáng chế để làm tăng hiệu quả và hoặc để làm ổn định các chế phẩm như vậy và các quá trình chống phân hủy và làm hỏng do, ví dụ, các điều kiện bất lợi mà xuất hiện trong quá trình sản xuất, vận chuyển, bảo quản, điều chế trước khi sử dụng, quá trình dùng, và sau đó.

Rất nhiều dạng trình bày có sẵn về sự ổn định hóa protein và các nguyên liệu và các phương pháp bào chế hữu dụng về mặt này, như Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," trong: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter và Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002), và Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, cụ thể là ở các phần thích hợp đối với các tá dược và các quá trình giống như đối với các chế phẩm protein tự tạo đệm theo sáng chế này, đặc biệt là như đối với các sản phẩm dược phẩm protein và các quá trình để sử dụng trong thú y và/hoặc y tế cho người.

Các muối có thể được sử dụng theo các phương án nhất định của sáng chế để, ví dụ, điều chỉnh lực ion và/hoặc tính đẳng trương của chế phẩm và/hoặc để làm tăng tính tan và/hoặc độ ổn định vật lý của protein hoặc thành phần khác của chế phẩm theo sáng chế.

Như đã được biết rõ, các ion có thể làm ổn định trạng thái tự nhiên của các protein bằng cách liên kết với các gốc tích điện ở bề mặt protein và bằng các nhóm chẵn tích điện và phân cực trong protein và làm giảm lực của các tương tác tĩnh điện, các tương tác hút, và đẩy của chúng. Các ion cũng có thể làm ổn định trạng thái biến tính của protein bằng liên kết, cụ thể, với các liên kết peptit biến tính ($--CONH$) của protein. Hơn nữa, tương tác ion với các nhóm tích điện và phân cực trong protein cũng có thể làm giảm các tương tác tĩnh điện liên phân tử và, bằng cách này, ngăn chặn hoặc làm giảm kết tụ và tính không tan của protein.

Các loại ion khác biệt rõ rệt về các ảnh hưởng của chúng trong các protein. Nhiều xếp loại rõ ràng về các ion và các ảnh hưởng của chúng trong các protein được phát triển mà có thể được sử dụng để bào chế các dược phẩm theo sáng chế. Một ví dụ là dãy Hofmeister, mà phân loại các chất tan ion và các chất tan phân cực không ion bằng ảnh hưởng của chúng đến độ ổn định cấu hình của các protein trong dung dịch. Các chất tan ổn định được gọi là "các chất tham gia vào độ ổn định và cấu trúc trong tương tác nước-nước, kosmotropic." Các chất tan bất ổn định được gọi là "chất phá vỡ mạng lưới liên kết hydro giữa các phân tử nước trong dung dịch nước (chaotropic). Các chất tham gia vào độ ổn định và cấu trúc của tương tác nước-nước thông thường được sử dụng tại các nồng độ cao (ví dụ, amoni sunfat $>1\text{mol}$) để tủa các protein từ dung dịch ("chất không điện phân sẽ ít tan ở các nồng độ muối cao, salting-out"). Các chất phá vỡ mạng lưới liên kết hydro giữa các phân tử nước trong dung dịch nước thông thường được sử dụng để biến tính và/hoặc để làm ổn định các protein ("tăng độ tan của chất tan khi tăng lực ion của dung dịch, salting-in"). Hiệu quả tương đối của các ion để "tăng độ tan của chất tan khi tăng lực ion của dung dịch, salt-in" và "chất không điện phân sẽ ít tan ở các nồng độ muối cao, salt-out" xác định vị trí của chúng trong dãy Hofmeister.

Các axit amin tự do có thể được sử dụng trong các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo các phương án khác của sáng chế như các chất đệm, các chất làm ổn định, và các chất chống oxy hóa, cũng như các sử dụng chuẩn khác. Lysin, prolin, serin, và alanin có thể được sử dụng để làm bền vững các protein trong chế phẩm. Glyxin là hữu dụng ở dạng đông khô để đảm bảo cấu trúc và tính chất bán chính xác. Arginin có thể hữu dụng để ức chế kết tụ protein, trong cả các chế phẩm lỏng và các chế phẩm được đông khô. Methionin là hữu dụng làm chất chống oxy hóa.

Các rượu đa chức bao gồm các đường, ví dụ, mannitol, sucroza, và sorbitol và các rượu polyhydric như, ví dụ, glyxerol và propylen glycol, và, đối với các mục đích thảo luận ở đây, polyetylen glycol (polyethylene glycol, PEG) và các cơ chất liên quan. Các rượu đa chức là chất tan ổn định. Chúng là các chất ổn định hữu dụng trong cả các chế phẩm lỏng và chế phẩm đông khô để bảo vệ các protein khỏi các quá trình phân hủy vật lý và hóa học. Các rượu đa chức cũng hữu dụng để điều chỉnh tính tương của các chế phẩm.

Trong số các rượu đa chức hữu dụng theo các phương án chọn lọc của sáng chế là mannitol, thường được sử dụng để đảm bảo độ ổn định cấu trúc của bánh trong các chế phẩm được làm đông khô. Nó đảm bảo độ ổn định cấu trúc đối với chế phẩm dạng bánh. Nó thường được sử dụng với chất bảo vệ dùng trong đông khô, ví dụ, sucroza. Sorbitol và sucroza là trong số các chất được ưu tiên để điều chỉnh tính trương và như các chất ổn định để bảo vệ chống những bất lợi trong quá trình đông-rã đông khi vận chuyển hoặc điều chế quy mô lớn trong quá trình sản xuất. Các đường khử (mà không chứa các nhóm aldehyt hoặc keton), như glucoza và lactoza, có thể kết hợp với các gốc lysin và arginin ở bề mặt. Do vậy, nói chung chúng không trong số các rượu đa chức được ưu tiên để sử dụng theo sáng chế. Ngoài ra, các đường mà tạo ra loại phản ứng như vậy, như sucroza, thủy phân thành fructoza và glucoza trong các điều kiện axit, và do đó gây ra liên kết giữa đường và protein (glycation), cũng không trong số các rượu đa chức được ưu tiên theo sáng chế về mặt này. PEG là hữu dụng để làm bền vững các protein và như chất bảo vệ mô sinh học không bị hư hại do đông lạnh và có thể được sử dụng theo sáng chế về mặt này.

Các phương án về các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L bao gồm thêm các chất có hoạt tính bề mặt. Các phân tử protein có thể dễ bị hút bám trên các bề mặt và bị biến tính và kết tập tạo ra tại các bề mặt chung khí-lỏng, các bề mặt chung rắn-lỏng, và các bề mặt chung lỏng-lỏng. Nói chung, các ảnh hưởng này tỷ lệ nghịch với nồng độ protein. Nói chung, các tương tác không có lợi này tỷ lệ nghịch với nồng độ protein và cụ thể là bị tăng bởi sự khuấy vật lý, như được tạo ra trong quá trình vận chuyển và sử dụng sản phẩm.

Các chất có hoạt tính bề mặt thường được sử dụng để ngăn chặn, giảm thiểu, hoặc làm giảm bề mặt hút bám. Các chất có hoạt tính bề mặt hữu dụng theo sáng chế về mặt này bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, các este axit béo khác của các sorbitan polyethoxylat, và poloxame 188.

Các chất có hoạt tính bề mặt cũng thường được sử dụng để kiểm soát độ ổn định cấu hình protein. Việc sử dụng các chất có hoạt tính bề mặt về mặt này là đặc hiệu protein do, chất có hoạt tính bề mặt đã cho bất kỳ thường là sẽ làm ổn định một số protein và làm bất ổn định các protein khác.

Các polysorbat dễ bị phân hủy do oxi hóa và thường, như được cung cấp, chứa các peroxit có lượng đủ để gây ra oxi hóa chuỗi bên trong các gốc protein, đặc biệt là methionin. Kết quả là các polysorbat được sử dụng cẩn thận, và khi sử dụng, được sử dụng tại nồng độ hữu hiệu thấp nhất của chúng. Về mặt này, các polysorbat làm ví dụ cho quy luật chung là các tá dược được sử dụng ở các nồng độ hữu hiệu thấp nhất của chúng.

Các phương án về các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L bao gồm thêm một hoặc nhiều chất chống oxi hóa. Các protein bị oxi hóa đến một mức độ có hại nhất định có thể được ngăn chặn trong các dược phẩm bằng cách duy trì các mức oxy và nhiệt độ môi trường xung quanh thích hợp và bằng cách tránh tiếp xúc với ánh sáng. Các tá dược là chất chống oxi hóa có thể cũng được sử dụng để ngăn chặn tốt các protein phân hủy do oxi hóa. Trong số các chất chống oxi hóa hữu dụng về mặt này là các chất khử, các chất loại oxi/không có gốc tự do, và các chất tạo cang. Các chất chống oxi hóa sử dụng trong các chế phẩm protein chữa bệnh theo sáng chế ưu tiên là hòa tan trong nước và duy trì hoạt tính của chúng trong suốt thời gian tồn tại của chính sản phẩm. EDTA là chất chống oxi hóa ưu tiên theo sáng chế về mặt này.

Các chất chống oxi hóa có thể làm hỏng các protein. Ví dụ, các chất khử, như glutathion cụ thể, có thể phá vỡ các liên kết disulfua trong phân tử. Như vậy, các chất chống oxi hóa sử dụng theo sáng chế được chọn, trong số các chất chống oxi hóa khác, để loại trừ hoặc làm giảm thích đáng khả năng gây hỏng các protein của chính chúng trong chế phẩm.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các ion kim loại mà là đồng yếu tố của protein và cần thiết để tạo ra các phức protein kết hợp, như kẽm cần để tạo ra các thể huyền phù nhất định của insulin. Các ion kim loại cũng có thể ức chế một số quá trình phân hủy các protein. Tuy nhiên, các ion kim loại cũng xúc tác các quá trình vật lý và hóa học mà phân hủy các protein.

Các ion magiê (10-120mM) có thể được sử dụng để ức chế axit aspartic bị đồng phân thành axit isoaspartic. Các ion Ca^{+2} (lên đến 100mM) có thể tăng độ ổn định của deoxyribonucleaza ở người. Tuy nhiên, Mg^{+2} , Mn^{+2} , và Zn^{+2} , có thể làm bất ổn định

rhDNaza. Tương tự, Ca^{+2} và Sr^{+2} có thể làm ổn định Yếu tố VIII, nó có thể bị khử ổn định bởi Mg^{+2} , Mn^{+2} và Zn^{+2} , Cu^{+2} và Fe^{+2} , và sự kết tập của nó có thể tăng bởi các ion Al^{+3} .

Các phương án về các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L bao gồm thêm một hoặc nhiều chất bảo quản. Các chất bảo quản là cần thiết khi phát triển các chế phẩm đa liều ngoài đường tiêu hóa mà liên quan đến nhiều hơn một lần rút từ cùng lọ chứa. Chức năng chủ yếu của chúng là ức chế vi sinh vật phát triển và đảm bảo tính vô trùng của sản phẩm trong suốt thời gian tồn tại của chính nó hoặc thời hạn sử dụng sản phẩm thuốc. Thông thường các chất bảo quản được sử dụng bao gồm rượu benzylic, phenol và m-cresol. Mặc dù các chất bảo quản có lịch sử sử dụng lâu dài với các phân tử nhỏ ngoài đường tiêu hóa, sự phát triển của các chế phẩm protein chứa các chất bảo quản có thể là thách thức. Các chất bảo quản hầu như luôn luôn có ảnh hưởng làm mất ổn định (kết tập) của các protein, và điều này trở thành yếu tố chính làm giới hạn việc sử dụng chúng trong các chế phẩm protein đa liều. Cho đến hiện nay, hầu hết các thuốc protein được tạo ra chỉ cho sử dụng một lần. Tuy nhiên, khi các chế phẩm đa liều có khả năng chấp nhận được, chúng có lợi thế thêm là tạo ra sự thuận tiện cho bệnh nhân, và làm tăng khả năng thương mại. Ví dụ rõ là về hormon sinh trưởng ở người (human growth hormone, hGH) trong đó sự phát triển của các chế phẩm được bảo quản dẫn đến sự thương mại hóa các bút tiêm thể hiện thuận tiện hơn, sử dụng nhiều lần. Ít nhất bốn thiết kế bút như vậy chứa các chế phẩm được bảo quản của hGH hiện nay là có sẵn trên thị trường. Norditropin (lỏng, Novo Nordisk), Nutropin AQ (lỏng, Genentech) & Genotropin (được đông khô—vỏ buồng đôi, Pharmacia & Upjohn) chứa phenol trong khi Somatropo (Eli Lilly) được tạo ra với m-cresol.

Một vài khía cạnh cần cân nhắc trong việc tạo ra và phát triển các dạng liều được bảo quản. Nồng độ bảo quản hữu hiệu trong sản phẩm thuốc phải được tối ưu hóa. Điều này yêu cầu thử nghiệm chất bảo quản đưa ra ở dạng liều có các phạm vi nồng độ mà tạo ra hiệu quả kháng vi sinh vật không có hại đến độ bền vững của protein.

Như có thể được dự kiến, việc phát triển các chế phẩm lỏng chứa các chất bảo quản là thách thức hơn so với các chế phẩm đông khô. Các sản phẩm lạnh khô có thể được đông khô không có chất bảo quản và được hoàn nguyên với chất pha loãng chứa chất bảo quản tại thời điểm sử dụng. Điều này làm giảm thời gian mà chất bảo quản tiếp xúc với protein,

tối thiểu hóa rõ rệt các nguy cơ liên quan đến độ ổn định. Với các chế phẩm lỏng, hiệu quả bảo quản và độ ổn định cần được duy trì trong toàn bộ thời gian tồn tại của chính sản phẩm (khoảng 18 đến 24 tháng). Điểm chú ý quan trọng là hiệu quả bảo quản nên được chứng minh trong chế phẩm cuối cùng chứa thuốc hoạt hóa và tất cả các thành phần tá dược.

Các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L nói chung sẽ được thiết kế cho các đường dùng và các phương pháp dùng cụ thể, cho các liều dùng cụ thể và các tần suất dùng, đối với các điều trị cụ thể của các bệnh cụ thể, có các phạm vi khả dụng sinh học và tính bền, trong số các đặc điểm khác. Các chế phẩm như vậy có thể được thiết kế theo sáng chế để phân phối bằng đường thích hợp bất kỳ, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở đường miệng, đường tai, đường mắt, đường trực tràng, và đường âm đạo, và ngoài đường tiêu hóa, bao gồm tiêm trong tĩnh mạch và tiêm trong động mạch, tiêm trong cơ, và tiêm dưới da.

Một khi được phẩm được bào chế, nó có thể được bảo quản trong các lọ vô trùng dưới dạng dung dịch, thể huyền phù, dạng gel, nhũ tương, dạng rắn, tinh thể, hoặc dưới dạng được khử nước hoặc bột được đông khô. Các chế phẩm như vậy có thể được bảo quản ở dạng sẵn dùng hoặc ở dạng (ví dụ, được đông khô) mà được hoàn nguyên trước khi dùng. Sáng chế cũng đề xuất các kit để tạo ra đơn vị dùng liều đơn. Các kit theo sáng chế mỗi kit có thể chứa cả lọ chứa thứ nhất có protein được làm khô và lọ chứa thứ hai có chế phẩm nước. Theo các phương án nhất định theo sáng chế này, các kit chứa bơm tiêm một ngăn và bơm tiêm nhiều ngăn chứa thuốc trước (ví dụ, các bơm tiêm lỏng và các bơm tiêm đông khô (lyosyringe)) được cung cấp.

Lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên CD27L được sử dụng sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, các điều kiện và các đối tượng chữa bệnh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá rằng các mức liều thích hợp để điều trị sẽ thay đổi phụ thuộc một phần vào phân tử được phân phối, dấu hiệu cho thấy protein liên kết kháng nguyên CD27L được sử dụng, đường dùng, và kích thước (thể trọng, kích thước bề mặt cơ thể hoặc kích thước cơ quan) và/hoặc tình trạng (độ tuổi và sức khỏe chung) của bệnh nhân. Theo các phương án cụ thể, bác sĩ lâm sàng có thể chuẩn độ liều lượng và thay đổi đường dùng để thu được tác dụng chữa bệnh tối ưu. Liều

cụ thể có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,1µg/kg lên đến khoảng 30mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc các yếu tố được đề cập trên đây. Theo các phương án cụ thể, liều này có thể nằm trong khoảng từ 1,0µg/kg lên đến khoảng 20mg/kg, tùy ý từ 10µg/kg lên đến khoảng 10mg/kg hoặc từ 100µg/kg lên đến khoảng 5mg/kg.

Lượng chữa bệnh hữu hiệu của protein liên kết kháng nguyên CD27L tốt hơn là làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, tăng tần suất hoặc thời gian các giai đoạn bệnh không có các triệu chứng bệnh hoặc ngăn chặn sự suy yếu hoặc ốm yếu do đau đớn của bệnh. Để điều trị các khối u biểu hiện CD27L, lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết kháng nguyên CD27L, ví dụ ADC kháng CD27L, tốt hơn là ức chế phát triển tế bào hoặc sinh trưởng khối u bằng ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, hoặc ít nhất khoảng 90% so với các bệnh nhân không được điều trị. Khả năng ức chế phát triển khối u của hợp chất có thể được đánh giá trong mô hình động vật dự đoán hiệu lực trong các khối u ở người.

Các dược phẩm có thể được dùng bằng cách sử dụng dụng cụ y tế. Các ví dụ về các dụng cụ y tế để dùng các dược phẩm được mô tả trong các Patent Mỹ Số 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; và 5.399.163, tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương pháp Chẩn đoán hoặc Điều trị Bệnh hoặc Rối loạn liên quan đến CD27L

Các protein liên kết kháng nguyên CD27L theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để phát hiện CD27L trong mẫu sinh học. Theo các phương án cụ thể, mẫu sinh học có được từ bệnh nhân được tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên CD27L. Sau đó liên kết của protein liên kết kháng nguyên CD27L với CD27L được phát hiện để xác định sự có mặt hoặc lượng CD27L liên quan ở mẫu. Các phương pháp như vậy có thể là hữu dụng để chẩn đoán hoặc xác định các bệnh nhân mà tuân theo điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên CD27L, ví dụ, ADC kháng CD27L.

Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên CD27L theo sáng chế được sử dụng để chẩn đoán, phát hiện, hoặc điều trị rối loạn tự miễn hoặc rối loạn do viêm. Trong điều trị rối loạn tự miễn hoặc các rối loạn do viêm, protein liên kết kháng nguyên CD27L có thể nhắm đích các tế bào biểu hiện CD27L của hệ miễn dịch để phá hủy và/hoặc có thể phong bế tương tác của CD27L với thụ thể CD27.

Tương tác CD27L với CD27 được cho là đóng vai trò trong các bệnh tự miễn được điều hòa bởi tế bào, như viêm não và dây cột sống tự miễn thực nghiệm (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) (Nakajima et al. (2000) *J. Neuroimmunol.* 109:188-96). Tác dụng này được cho là được điều hòa một phần bởi ức chế sự tạo thành TNF- α . Hơn nữa, phong bế tín hiệu CD27L ức chế sự phát triển của dòng tế bào được điều hòa bởi CD40 của các tế bào CD8⁺ T và làm giảm các tế bào T ghi nhớ CD8⁺ tạo thành (Taraban et al. (2004) *J. Immunol.* 173:6542-6). Được hiểu theo cách thông thường, các protein liên kết kháng nguyên CD27L có thể được sử dụng để điều trị đối tượng có rối loạn tự miễn, ví dụ, rối loạn được đặc trưng bằng sự có mặt của các tế bào B biểu hiện CD27L bao gồm, ví dụ, bệnh viêm não và dây cột sống tự miễn thực nghiệm. Các rối loạn tự miễn bổ sung trong đó các kháng thể theo bậc lộ này có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở bệnh lupus ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus, SLE), bệnh đái đường phụ thuộc insulin (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM), bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease, IBD) (bao gồm Bệnh Crohn, viêm loét đại tràng và bệnh Celiac), đa xơ cứng (multiple sclerosis, MS), bệnh vẩy nến, viêm tuyến giáp tự miễn, viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis, RA) và viêm tiểu cầu thận. Hơn nữa, các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo bậc lộ này có thể được sử dụng để ức chế hoặc ngăn chặn sự loại bỏ do cấy ghép hoặc trong điều trị bệnh mô ghép chống lại vật chủ (graft versus host disease, GVHD).

Ngoài ra, tương tác của CD27L với CD27 cũng được cho là có vai trò trong quá trình truyền tín hiệu ở các tế bào CD4⁺ T. Một số virus đã được thể hiện để truyền tín hiệu con đường CD27, dẫn đến sự phá hủy các đáp ứng của kháng thể trung hòa (Matter et al. (2006) *J Exp Med* 203:2145-55). Được hiểu theo cách thông thường, các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L và các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để

điều trị đối tượng bị nhiễm virus bao gồm, ví dụ, các nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus, HIV), các virus gây Viêm gan (A, B, & C), virus gây bệnh Herpes, (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II và CMV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus cúm, các flavivirus, virus echo, rhinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus hợp bào hô hấp, virus quai bị, rotavirus, virus sởi, virus rubella (bệnh sởi Đức), parvovirus, virus vaccinia (bệnh đậu mùa), virus HTLV, virus dengue, papillomavirus, virus molluscum (u mềm lây), virus bại liệt, virus bệnh dại, virus JC và virus gây viêm não ở động vật chân khớp (arboviral encephalitis virus) và virus gây bệnh viêm màng não tuỷ (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) hoặc trong điều trị nhiễm HIV/AIDS. Ngoài ra, các kháng thể người, các chế phẩm kháng thể và các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế quá trình sản xuất TNF- α .

Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên CD27L theo sáng chế được sử dụng để chẩn đoán, phát hiện, hoặc điều trị bệnh ung thư hoặc rối loạn có xu hướng nổi u. Các khối u và ung thư tuân theo điều trị ở đây, trong đó các tế bào khối u hoặc ung thư có thể biểu hiện CD27L bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: các ung thư biểu mô tế bào thận (RCC), như RCC loại tế bào sáng, RCC nhú, RCC kỵ nhuộm màu (chromophobe), và tương tự, u nguyên bào đệm, các bệnh ung thư đầu và cổ (ví dụ, các ung thư biểu mô tế bào vảy (Head and Neck squamous cell carcinomas, HNSCC), và tương tự), ung thư vú, các khối u não, các ung thư biểu mô vòm mũi họng, u lympho không phải Hodgkin (non-Hodgkin's lymphoma NHL), như NHL độ thấp, NHL tế bào lớn lan tỏa, và tương tự, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL), như ALL tiền tế bào B-, và tương tự, bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính (CLL hoặc B-CLL), u lympho Burkitt, các u lympho tế bào lớn thoái biến (anaplastic large-cell lymphomas, ALCL), đa u tủy, các u lympho tế bào T ở da, các u lympho hạch tế bào nhỏ bị phân cắt (nodular small cleaved-cell lymphomas), các u lympho ở lympho bào (lymphocytic lymphomas), các u lympho tế bào T ngoại biên, các u lympho Lennert, các lympho nguyên bào miễn dịch, bệnh bạch cầu/các u lympho tế bào T (T-cell leukemia/lymphomas, ATLL), bệnh bạch cầu tế bào T người lớn (adult T-cell leukemia, T-ALL), ung thư u lympho tuyến nang ở nguyên bào ruột/ tế bào trung tâm (enteroblastic/centrocytic (cb/cc) follicular lymphomas cancers), các u lympho tế

bào lớn lan tỏa của dòng B, u lympho tế bào T tương tự hạch lympho phù mạch (angioimmunoblastic lymphadenopathy AILD), u lympho tại khoang cơ thể liên quan đến HIV, các ung thư biểu mô phổi, các ung thư biểu mô chưa biệt hóa ở mũi-họng (ví dụ, khối u Schmincke), bệnh Castleman, saccôm Kaposi, đa u tủy, u macroglobulin huyết Waldenstrom và các u lympho tế bào B khác. Các dạng khối u bổ sung tuân theo điều trị ở đây, bao gồm các khối u ở: thận, tuyến tụy, thanh quản hoặc họng, u melanin, buồng trứng, ung thư tuyến phổi, ruột kết, vú, não, và các bộ phận tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây, cả thực tế và tiên đoán, được cung cấp nhằm mục đích minh họa các phương án cụ thể hoặc các đặc trưng của sáng chế này và dự định để giới hạn phạm vi của nó.

Ví dụ 1 - Các kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh ở người kháng CD27L

Sự tạo thành các kháng thể hoàn chỉnh của người hướng đến kháng CD27L người được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật XENOMOUSE® (các Patent Mỹ Số 6.114.598; 6.162.963; 6.833.268; 7.049.426; 7.064.244, mà toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn; Green *et al.*, 1994, *Nature Genetics* 7:13-21; Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156; Green and Jakobovitis, 1998, *J. Ex. Med.* 188:483-495).

Các con chuột XENOMOUSE® có IgG1, IgG2, và IgG4 được gây miễn dịch/được tiêm tăng cường với CD27L hòa tan ở người hoặc CD27L người được biểu hiện tái tổ hợp ở bề mặt các tế bào Buồng trứng Chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary, CHO). Các tế bào lai được tạo ra từ các chuột được gây miễn dịch. Các dịch nổi tế bào lai được sàng lọc đối với sự liên kết với các tế bào 293 biểu hiện CD27L người tái tổ hợp. Hơn 260 dịch nổi là dương tính đối với liên kết.

Các dịch nổi dương tính này sau đó được sàng lọc đối với sự liên kết với CD27L tự nhiên trên bề mặt của các tế bào Raji và/hoặc các tế bào 786-0. Thử nghiệm liên kết với CD27L tự nhiên bộc lộ 161 dịch nổi dương tính.

Các dịch nổi này được thử nghiệm về tính phản ứng chéo với CD27L khi cynomolgus. Hai mươi lăm dịch nổi là dương tính về tính phản ứng chéo với CD27L khi cynomolgus. Hai mươi lăm dịch nổi này sau đó được thử nghiệm về hoạt tính CDC và khả năng phong bế CD27L người liên kết với CD27 người. Mười chín dịch nổi là dương tính về hoạt tính CDC và về ức chế CD27 liên kết với CD27L. Nhân dòng tiếp sau và giải trình tự 13 dòng IgG1 và 6 dòng IgG4 phát hiện 7 kháng thể IgG1 duy nhất (Ab1-Ab7) và 1 kháng thể IgG4 duy nhất (Ab8).

Phần tóm tắt các đặc tính của tám kháng thể cùng với các đặc tính của dạng kháng thể khảm ở chuột kháng CD27L ở người có bán sẵn được đưa ra trong FIG. 1.

Ái lực

Ái lực đối với CD27L người tái tổ hợp hòa tan được xác định bằng cách sử dụng chip CM5 trên BIACORE 3000. Kháng thể dê kháng IgG người được sử dụng để bắt giữ kháng thể thử nghiệm. Liên kết và phân ly CD27L người hòa tan được gắn đuôi Histidin được đo để xác định K_a , K_d , và K_D . Các điều kiện là như sau:

Nhiệt độ = 25°C

Tốc độ chảy = 50ul/phút

Đệm Chạy = HBS-EP

Tái tạo với Glyxin 10mM độ pH 1,5

Phạm vi nồng độ của Hu CD27L-his là 200nM → 0,217nM

Phương thức thích hợp (Scrubber2): Liên kết 1:1 + Rmax khu trú

5 Phút Kết hợp và 25 Phút Phân ly

Hoạt tính ADCC

Thử nghiệm ADCC được thực hiện trong đĩa nuôi cấy mô vô trùng đáy tròn 96 giếng (Corning). Các kháng thể được xác định hiệu giá từ 20µg/mL đến 0,0002µg/mL bằng cách lấy 10µL trong 100µL RPMI hoàn chỉnh chứa FCS 10% (pha loãng 1:10). Các đích đánh dấu bằng calcein được bổ sung, 50 µL chứa 10.000 tế bào. Các tế bào đích và các

nồng độ kháng thể khác nhau được ủ trong 40 phút tại 4°C, sau đó các yếu tố tác động tế bào NK được bổ sung, 50µL chứa 200.000 tế bào. Các dịch nuôi cấy được ủ trong 4 giờ tại 37°C sau đó các dịch nổi được dồn chung và được thử nghiệm về sự giải phóng calcein bằng cách đo phát huỳnh quang tại 485-535nm trên máy đếm Wallac Victor II 1420 Multilable HTS. Các giá trị dung giải 100% được xác định bằng sáu giếng dung giải của các đích Raji được đánh dấu calcein với chất tẩy Igepal 630 (3µL mỗi giếng) và các giá trị dung giải tự nhiên được xác định bằng cách đo phát huỳnh quang ở các dịch nổi từ các đích riêng.

Phần trăm (%) dung giải cụ thể được xác định là (phát huỳnh quang của mẫu) – (phát huỳnh quang do dung giải tự nhiên)/(dung giải 100% – phát huỳnh quang do dung giải tự nhiên). Dữ liệu thô được đưa vào bảng tính trong Excel có công thức được gắn vào để tính toán % dung giải cụ thể và các giá trị kết quả được chuyển đến chương trình đồ thị (GraphPad Prism) trong đó các dữ liệu được chuyển thành đồ thị đường cong xích ma phù hợp (sigmoidal curve fit graph). Các phân tích sau (các tính toán hồi quy tuyến tính) được thực hiện trong GraphPad để tạo ra các giá trị EC₅₀.

Hoạt tính ADCP

Các bạch cầu đơn nhân là âm tính được chọn từ ở máu ngoại biên ở người và được bảo quản ở phòng lạnh 4°C qua đêm trong môi trường RPMI 1640 chứa FBS 10%. Sau đó các bạch cầu đơn nhân này được cấy vào đĩa nuôi cấy mô 48 giếng có 200.000 tế bào mỗi giếng với 200µL môi trường phát triển (RPMI 1640 chứa FBS 10% và Hu M-CSF 40ng/ml) và được ủ tại 37°C, CO₂ 5% trong 6 ngày để cho các bạch cầu đơn nhân biệt hóa thành các đại thực bào.

Vào ngày 6, thử nghiệm ADCP được thực hiện như sau:

1. Đánh dấu các tế bào đích với chất nhuộm xanh lá cây PKH67 có các nồng độ cuối cùng của chất nhuộm PKH67 là 2×10^{-6} M
 - Các tế bào khối u được thu và được rửa chỉ một lần với PBS bằng cách ly tâm các tế bào (400 g) trong 5 phút.

- Sau khi ly tâm các tế bào, dịch nổi được hút ra cẩn thận, nhưng để lại không quá 25mL dịch nổi.
 - Bốn μ L dung dịch chất nhuộm etanol PKH67 có nồng độ gốc là 4×10^{-6} M được bổ sung vào 1ml chất pha loãng C từ kit trong ống polypropylen và được trộn kỹ.
 - Các viên tế bào được tạo huyền phù trong 1mL chất pha loãng C có mật độ là 20×10^6 trong ống polypropylen.
 - Các tế bào được chuyển nhanh vào dung dịch chất nhuộm hoạt động được trộn nhẹ nhàng bằng pipet để đảm bảo sự phân tán hoàn chỉnh.
 - Hỗn hợp được ủ tại nhiệt độ phòng trong 4 phút được trộn định kỳ.
 - Hai mL FBS hoạt hóa toàn phần được bổ sung vào các tế bào để dừng quá trình nhuộm và được ủ tại nhiệt độ phòng trong 1 phút để cho phép chất nhuộm dư thừa liên kết.
 - Bốn mươi mL RPMI chứa FBS 10% được bổ sung vào các tế bào và được rửa chỉ một lần bằng cách ly tâm các tế bào ($400 \times g$) trong 10 phút.
 - Các viên tế bào được tạo huyền phù trong 40mL môi trường lần nữa và được chuyển vào ống mới.
 - Các tế bào được rửa ba lần nữa với môi trường RPMI +FBS 10% và 1x với môi trường phát triển hoàn chỉnh (RPMI 1640 chứa FBS 10% và Hu M-CSF 40ng/ml).
 - Các tế bào được đếm và được tạo huyền phù trong môi trường phát triển có 1×10^6 tế bào mỗi mL đối với T:E tại tỷ lệ 1:2.
2. Điều trị các tế bào khối u bằng các kháng thể cho hiện tượng thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP)

- Các dung dịch pha loãng của kháng thể được chuẩn bị trong môi trường phát triển đại thực bào. Các dung dịch pha loãng này được cô đặc cao hơn bốn lần các nồng độ cuối cùng.
 - Để ủ trước các tế bào đích được đánh dấu PKH67 xanh lá cây với các kháng thể, 280ul kháng thể cô đặc 4x được trộn với 280ul tế bào khối u đánh dấu xanh lá cây và được ủ tại 4°C trong 30 phút.
 - Hỗn hợp các tế bào khối u được đánh dấu xanh lá cây với các kháng thể kháng khối u được bổ sung vào các tế bào đại thực bào trong đĩa 48 giếng là 200μl cho mỗi giếng như được biểu thị trong bảng Thiết kế Thí nghiệm dưới đây. Thể tích cuối cùng là 0,4ml mỗi giếng. Tỷ lệ các tế bào đích so với các tế bào ảnh hưởng (các đại thực bào) là 1:2.
 - Các tế bào được ủ tại 37°C, CO₂ 5% trong một giờ.
3. Các đại thực bào phản nhuộm với chỉ thị của các đại thực bào
- Các tế bào đích và các đại thực bào trong đĩa 48 giếng được làm bong bằng hỗn hợp Trypsin-Versen.
 - Các tế bào được chuyển vào khối 96 giếng có thể tích 2,2ml mỗi giếng và được rửa chỉ một lần với dung dịch rửa FASC được làm ấm trước bằng cách quay các khối này tại 400' g trong 5 phút và sau đó loại bỏ dịch nổi.
 - Các đại thực bào được nhuộm với chỉ thị của chúng, CD11b-Biotin tại độ pha loãng 1:200 trong dung dịch phong bế ở 100μl mỗi giếng trong 10 phút trên đá.
 - Sau khi rửa các tế bào một lần, các đại thực bào được phát hiện với streptavidin Alexa 568 tại độ pha loãng là 1:1000 trong 10 phút trên đá.
 - Sau khi rửa các tế bào 1x với PBS, các tế bào được cố định với formaldehyt-PBS 4% tại nhiệt độ phòng trong 20 phút. sau đó các tế bào được rửa 1x với dH₂O.

- Các viên tế bào được tái tạo huyền phù trong 200 μ l nước mỗi giếng và được chuyển vào đĩa 96 giếng ở 100 μ l mỗi giếng.

4. Đo định lượng hoạt tính sự thực bào ở máy đọc ArrayScan V^{TI} HCS (phiên bản 6, Cellomics Inc. Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) có ứng dụng sinh học đích hoạt hóa (Target Activation BioApplication) sử dụng vật kính 20x. Cài đặt bộ lọc được nêu trong Bảng 2. Ít nhất 200 tế bào được đếm trong mỗi giếng.

Bảng 2

Kênh	Đích	Chất đánh dấu	Flo
1	các đại thực bào	Ms-anti-Hu CD11b Biotin→streptavidin Alexa 568	đỏ
2	Các tế bào khối u	PHK67	xanh

Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA). Sơ đồ thể hiện % sự thực bào tế bào khối u so với log của nồng độ kháng thể theo ng/ml. Phần trăm sự thực bào tế bào khối u được thể hiện bằng phần trăm các tế bào khối u chồng lên các đại thực bào so với tổng các đại thực bào trong các miền được chọn và thu được từ đặc điểm đầu ra của máy đọc ArrayScan “%ObjectCounts”. Các giá trị % được biểu hiện dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn (standard error of the mean, SEM) đối với các phép đo lặp lại ($n = 2$). EC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng phương pháp hồi quy không tuyến tính (đường cong phù hợp) sau đó sử dụng phương trình đáp ứng liều xich-ma (Sigmoidal dose- response equation). Các số liệu được chuẩn hóa để tối đa và tối thiểu tín hiệu và làm phù hợp với đường cong đáp ứng liều xich-ma.

Hoạt tính CDC

Chuẩn bị các tế bào khối u: các tế bào Raji chỉ được rửa một lần với môi trường thử nghiệm và được tái tạo huyền phù trong môi trường thử nghiệm (RPMI 1640 cộng với FBS 1%). Các tế bào được cấy trong đĩa nuôi cấy mô 96 giếng ở 50 μ L mỗi giếng với hai mật độ tế bào cho cả các phân bổ sung của thỏ và của người. Đối với phân bổ sung của thỏ,

mật độ tế bào là 5×10^4 tế bào mỗi giếng. Đối với phần bổ sung của người, mật độ tế bào là 2×10^5 tế bào mỗi giếng.

Xử lý các tế bào với phần bổ sung và kháng thể thử nghiệm: các phần bổ sung được cô đặc ba lần được chuẩn bị trong môi trường thử nghiệm như được nêu trong Bảng 3. Sau đó chúng được bổ sung vào các tế bào trong các đĩa ở 50 μ L mỗi giếng. Đối với các tế bào được xử lý bằng phần bổ sung của thỏ, nồng độ cuối cùng của phần bổ sung của thỏ là 10%; đối với các tế bào được xử lý bằng phần bổ sung của người, nồng độ cuối cùng của phần bổ sung của người là 20%.

Bảng 3: Chuẩn bị phần bổ sung được cô đặc 3 lần trong môi trường thử nghiệm (RPMI 1640+FBS 1%)			
3 lần phần bổ sung	Phần bổ sung (ml)	Môi trường thử nghiệm (ml)	Tổng thể tích (ml)
30% HI C' thỏ (bất hoạt)	0,5	1,16	1,66
30% không có HI C' thỏ (hoạt tính)	2,5	5,83	8,33
60% HI Hu C' (bất hoạt)	0,5	0,33	0,83
60% không có HI Hu C' (hoạt tính)	3	2,0	5,0

Các kháng thể thử nghiệm tại 10 μ g/mL được bổ sung vào các tế bào tại 50 μ L mỗi giếng. Tổng thể tích trong mỗi giếng của dịch nuôi cấy ban đầu là 150 μ L. Các tế bào được ủ liên tục tại 37°C, CO₂ 5% trong một giờ đối với các tế bào được xử lý bằng phần bổ sung của thỏ và 6 giờ đối với các tế bào được xử lý bằng phần bổ sung của người.

Đo tính gây độc tế bào bằng máy đọc đĩa ArrayScan: Sau khi ủ, 50 μ L môi trường trong mỗi giếng bị loại bỏ. Hỗn hợp Hoechst 33342 và propidium iodide (propidium iodide, PI) mà được chuẩn bị với độ pha loãng 1:1000 trong dung dịch PBS chứa FBS 2% được bổ sung vào các tế bào tại 100 μ L mỗi giếng. Các tế bào được xử lý bằng phần bổ sung của người được chuyển vào đĩa mới có 96 giếng với 40 μ L mỗi giếng sau khi trộn nhẹ nhàng. Các mẫu được phân tích trên máy đọc ArrayScan V^{TI} HCS (phiên bản 6, Cellomics,

Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) có Ứng dụng Sinh học Đích Hoạt hóa (Target Activation BioApplication) sử dụng vật kính 20x. Cài đặt bộ lọc được thể hiện trong Bảng 4. Ít nhất 200 tế bào được đếm trong mỗi giếng.

Bảng 4

Kênh	Đích	Chất đánh dấu	Phát huỳnh quang	Kính lọc
1	Axit nucleic đối với tất cả các tế bào	Hoechst 33342	UV/460nm	DAPI
2	Axit nucleic đối với các tế bào bị chết	Propidium iodua	488/>575nm	TRITC

Phân tích thống kê: Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA).

Thời gian nội bào hóa

Cấy các tế bào: các tế bào 786-0 được cấy vào đĩa 96 giếng với 10.000 tế bào mỗi giếng cùng với 100µL môi trường phát triển (RPMI chứa FBS 10%) và được ủ tại 37°C, CO₂ 5% trong 2 ngày để đạt đến 100% độ hợp lưu tế bào vào ngày thử nghiệm. Các tế bào được cấy trên đĩa được đánh giá về 1) sự nội bào hóa và 2) sự đồng định vị hạt cơ quan nội bào.

Nhuộm các tế bào cho quá trình nội bào hóa: Đĩa được rửa 1x với môi trường thử nghiệm (PBS chứa 2% FBS). Các kháng thể được bổ sung vào các giếng tại 2µg/mL mỗi giếng (100µL mỗi giếng) trong môi trường thử nghiệm. Các kháng thể của người được cho phép liên kết với các tế bào tại 4°C trong 30 phút và sau đó được rửa 1x với môi trường thử nghiệm. Alexa 488 kháng Fab' của IgG ở người (1:100) và Hoechst 33342 (1:2000) được bổ sung vào các tế bào trong môi trường thử nghiệm tại 4°C trong 20 phút. Tiếp theo các tế bào được rửa 1x với môi trường thử nghiệm. Các tế bào được cố định và được thấm, bắt đầu tại thời điểm không hoặc được ủ tại 37°C, CO₂ 5% trong 1, 3, hoặc 5 giờ. Sau khi ủ, các tế bào được cố định và được thấm bằng quy trình sau đây. Các tế bào được rửa 1x với đệm rửa BD, sau đó bổ sung dung dịch Fix/perm vào các giếng tại 100µL mỗi giếng.

Các mẫu được phân tích ở máy đọc ArrayScan V^{TI} HCS (phiên bản 6, Cellomics, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) có Ứng dụng Sinh học (BioApplication) “Phát hiện Điểm, Spot Detector” sử dụng vật kính 40x. Cài đặt bộ lọc cho sự nội bào hóa được thể hiện trong Bảng 5. Ít nhất 400 tế bào được đếm trong mỗi giếng.

Bảng 5

Kênh	Đích	Đánh dấu	Kính lọc
1	Axit nucleic đối với tất cả các tế bào	Hoechst 33342	DAPI (xanh nước biển)
2	Các điểm được nội bào hóa	Alexa 488	FITC (xanh lá cây)

Các tế bào nhuộm đếm để đồng định vị các điểm được nội bào đến ngăn hạt nội bào sớm: Sau khi phân tích nội bào hóa, các tế bào 786-0 được rửa 1x với đệm BD. Các tế bào được thăm dò đối với dung dịch Fix/perm tại nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau hai bước rửa, các tế bào được ủ với EEA-1 trong đệm BD tại 0,5µg/mL (100µl/giếng) tại nhiệt độ phòng trong 20 phút. Các tế bào được rửa 1x với đệm BD và được bổ sung với Alexa 568 kháng chuột tại độ pha loãng 1:1000. Các tế bào được ủ tại nhiệt độ phòng trong 20 phút sau đó là hai bước rửa với dung dịch đệm BD.

Chụp các hình ảnh: Các hình ảnh tế bào đối với quá trình nội bào hóa và cùng vị trí được chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang Leica nối với máy ảnh kỹ thuật số Hamamatsu có phần mềm Phân tích Hình ảnh Openlab (Improvision Inc, Lexington, MA) hoặc máy đọc ArrayScan V^{TI} HCS.

Phân tích thống kê: Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA). Số đếm điểm được biểu hiện dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn (standard error of the mean SEM) đối với các phép đo lặp lại ($n = 2$). Bằng cách sử dụng công cụ phân tích, số đếm điểm trên mỗi đơn vị thời gian (tốc độ nội bào hóa) là phù hợp với phương trình kết hợp số mũ một pha (one phase exponential association equation).

Ví dụ 2 – Đánh giá các kháng thể được cộng hợp với MCC-DM1

Ab1, Ab2, Ab4, Ab7, và Ab8 được cộng hợp với MCC-DM1 (xem Fig. 12). Mức nạp đích là 4,5-5 thuốc trên một kháng thể. Vấn đề là, các lysin của kháng thể được cộng hợp với NHS-este của cầu nối chéo hai chức năng khác loại Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] xyclohexan-1-carboxylat (Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate, SMCC) mà chứa NHS-este và maleimit. Tiếp theo kháng thể được biến đổi cầu nối được tinh chế từ cầu nối dư thừa và sau đó được cộng hợp với đầu hoạt động DM1 qua sulfhydryl có mặt trên DM1. DM1 dư thừa sau đó bị loại bỏ bằng bước tinh chế thứ hai để tạo ra thể cộng hợp Ab-MCC-DM1 cuối cùng.

Cụ thể hơn là, kháng thể CD27L, được biểu hiện tạm thời ở các tế bào 2936-E thể nuôi cấy tế bào động vật có vú, nạp vào cột MabSelect SuRe (GE Healthcare) được cân bằng trong Tris 25mM, Natri Clorua 150mM, độ pH 7,4. Sau đó, cột có kháng thể CD27L bám, được rửa bằng 3 bước rửa: đầu tiên là bước rửa đệm cân bằng, tiếp theo là rửa bằng Tris 25mM, L-Arginin 500mM, độ pH là 7,5 và bước rửa cuối cùng với đệm cân bằng. Kháng thể CD27L được rửa giải với Natri Axetat 100mM, độ pH 3,5. Các đoạn chứa kháng thể được dồn chung và được điều chỉnh đến độ pH cuối cùng là 5,0 với Tris 1M, độ pH 8,0. Kháng thể sau đó được tinh chế trên cột Fractogel® EMD SO3-(M) (EMD Chemicals Inc) được cân bằng trong Natri Axetat 30mM, độ pH 5,0. Kháng thể bám được rửa giải với gradien 8 lần thể tích cột (CV) từ Natri Clorua 0 đến 0,8M trong Natri Axetat 30mM, độ pH 5,0. Các đoạn chứa kháng thể được dồn chung và được thẩm tách trong Đệm Cộng hợp (EDTA 2mM, Natri Clorua 50mM, Kali Phosphat 50mM, độ pH 6,5).

Kháng thể CD27L đã tinh chế được biến đổi với cầu nối phản ứng amin Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)xyclohexan-1-carboxylat (Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, SMCC) (Thermo Scientific) để đưa các nhóm maleimit phản ứng thiol vào. Kháng thể có nồng độ là 55µM được xử lý với 20 đương lượng mol của SMCC trong Đệm Cộng hợp được điều chỉnh với dimethylacetamid 10% (thể tích/thể tích) trong hỗn hợp phản ứng cuối cùng. Sau khi ủ trong 90 phút tại nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được loại muối bằng Cột loại muối HiPrep 26/10 chứa hạt Sephadex G-25 mịn (GE Healthcare) được cân bằng trong EDTA 2mM, Natri Clorua 150mM, Natri Xitrate 35mM, độ pH 5,0. Các đoạn chứa kháng thể được dồn chung

và được thử nghiệm về mức biến đổi với cầu nối bằng cách sử dụng chất phản ứng Ellman (axit 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic]) như được mô tả dưới đây. Kháng thể được thấy là bị biến đổi với trung bình là 7,5 nhóm maleimit trên một kháng thể.

Chất phản ứng Ellman bị phân cắt bằng các thiol, tạo ra sản phẩm màu vàng có độ hấp thụ tại 412nm. Thử nghiệm Ellman loại trừ được sử dụng để xác định số các nhóm maleimit ở kháng thể CD27L sau khi phản ứng với SMCC. Kháng thể CD27L được biến đổi với SMCC hoặc mẫu đối chứng là đệm không có kháng thể được ủ với nồng độ tương đương của các thiol, DTT 0,4mM (dithiothreitol). Các maleimit bất kỳ có mặt trong mẫu kháng thể phản ứng với các thiol trong DTT, làm cho nó không có sẵn cho phản ứng khác với chất phản ứng Ellman. Chất phản ứng Ellman sau đó được bổ sung vào cả các mẫu và định lượng màu tại 412nm được tạo ra để xác định nồng độ của chất phản ứng Ellman được phản ứng. Nồng độ các thiol bị giảm ở mẫu kháng thể khi so với mẫu đối chứng là tỷ lệ tương ứng với số lượng các maleimit có trong mẫu kháng thể. Giá trị này được sử dụng để xác định số lượng các nhóm maleimit được liên kết trên một kháng thể CD27L được biến đổi.

Kháng thể CD27L được biến đổi SMCC (7,5 nhóm maleimit trên một kháng thể) tại nồng độ từ 17 μ M - 27 μ M được xử lý bằng 1,7 đương lượng mol của DM1 (Immunogen) trên một nhóm maleimit được tạo đệm với EDTA 2mM, NaCl 150mM, Natri Xitrate 35mM, độ pH 5,0 được điều chỉnh với DMA 3% (thể tích/thể tích) trong hỗn hợp phản ứng cuối cùng. Các hỗn hợp phản ứng được ủ tại nhiệt độ phòng qua đêm cho đến 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được nạp trên cột lọc gel Superdex 200 (GE Healthcare) được cân bằng với Natri Phosphat 20mM, Natri Clorua 150mM, độ pH 6,5. Các phân đoạn được thu và các phân đoạn chứa kháng thể đơn giá được dồn chung và được thử nghiệm. Tỷ lệ mol của các phân tử DM1 đã liên kết trên một kháng thể được xác định bằng cách đo độ hấp thụ tại 252nm và 280nm, và được thấy là 4,5 – 5,0 phân tử DM1 trên một kháng thể.

Dược lý in vitro

Các thể cộng hợp thuốc - kháng thể (ADC) Ab4- và Ab8-MCC-DM1 chứng minh sự liên kết của CD27L tự nhiên có thể so sánh được với các liên kết tương ứng không cộng

hợp của chúng khi được đánh giá bằng cách đếm tế bào theo dòng. EC50 liên kết được quan sát đối với Ab4 và Ab4-MCC-DM1 là giống nhau trong khi bình thường là Ab8-MCC-DM1 thấp hơn 4 lần so với Ab8 (Bảng 6). Phép đo chính xác hơn về ái lực liên kết được xác định đối với Ab4, Ab8 và các thể cộng hợp tương ứng của chúng bằng cách đo khả năng liên kết của chúng với CD27L tự nhiên ở người được biểu hiện ở các tế bào Raji bằng cách sử dụng kỹ thuật Gyros. Các kết quả cho thấy là cả các thể cộng hợp biểu lộ các ái lực dưới-nM (sub-nM) đối với CD27L trong phạm vi hai lần các ái lực được quan sát đối với Ab4 và Ab8 không cộng hợp (Bảng 6). Cả Ab4 và Ab8 không được cộng hợp và được cộng hợp cũng biểu lộ các ái lực liên kết với CD27L-his hòa tan ở người trong phạm vi 2 lần theo mỗi kháng thể như được xác định bằng BIACORE.

Bảng 6. So sánh liên kết của Ab4 và Ab8 với các thể cộng hợp tương ứng MCC-DM1 của chúng

Đo	Ab4	Ab4-MCC-DM1	Ab8	Ab8-MCC-DM1
Gyros K_D —CD27L tự nhiên-Raji	0,014nM	0,023nM	0,078nM	0,077nM
FACS (EC ₅₀)— 786-0	0,1nM	0,1nM	0,02nM	0,08nM

Nội bào hóa của Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1, Ab4, và Ab8 được đánh giá ở dòng 786-0 ccRCC biểu hiện CD27L ở người. Các tế bào 786-0 biểu hiện CD27L được tiếp xúc với kháng thể Ab4 và Ab8 không cộng hợp kháng CD27L ở người, Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1, HuIgG1 đối chứng, hoặc α SA-MCC-DM1 đối chứng và cho liên kết tại 4°C. Nội bào hóa của các kháng thể thử nghiệm được đánh giá bằng cách sử dụng Alexa 488 FluoroNanogold ở dê kháng IgG Fab' của người. Các tế bào được cố định và được nhuộm tại các thời điểm cụ thể sau khi ủ với các kháng thể thử nghiệm (thời điểm = 0, 1, 3, và 5 giờ) và được chụp hình bằng cách sử dụng máy đọc ArrayScan VTI HCS. Sự đồng định vị hóa các kháng thể thử nghiệm được nội bào hóa với các hạt cơ quan nội bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng EEA-1, chỉ thị hạt cơ quan nội bào. Nội bào hóa phụ thuộc thời gian của các kháng thể, bao gồm Ab4-MCC-DM1, được quan sát qua các phân tích hình ảnh soi kính hiển vi huỳnh quang bằng các vết có chấm nhỏ tạo thành

trong tế bào chất của tế bào tại 37°C so với vị trí màng tế bào tại thời điểm không tại 4°C. Ab4-MCC-DM1 được đồng định vị với chỉ thị hạt cơ quan nội bào EEA-1 sau 5 giờ ủ tại 37°C, chứng minh là Ab4-MCC-DM1 được nội bào hóa vào ngăn tế bào con hạt cơ quan nội bào ở các tế bào 786-0. Mức độ và tốc độ nội bào hóa là trong phạm vi tương tự đối với Ab4, Ab8 và các thể tương ứng được cộng hợp của chúng (Fig. 2).

Cả Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 đã chứng minh tiềm năng và tính đặc hiệu trong việc ức chế các tế bào khối u biểu hiện CD27L phát triển *in vitro*. Trong thử nghiệm chống tăng sinh (ức chế phát triển khối u), Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1 hoặc Ab4 hoặc Ab8 không cộng hợp kháng CD27L được ủ với luxiferaza 786-0 biểu hiện CD27L hoặc các tế bào đích H1650 âm tính CD27L khi có mặt/vắng mặt Ab4 hoặc Ab8 trần, tương ứng, hoặc HuIgG1 đối chứng trong 4 ngày. Cả các dòng tế bào, luxiferaza 786-0 và H1650, được đặt vào các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng có môi trường phát triển là 100µL trong giếng với 500 tế bào mỗi giếng đối với luxiferaza 786-0 và 1000 tế bào mỗi giếng đối với H1650. Tất cả các đĩa được ủ tại 37°C, CO₂ 5% trong 4 giờ. Sau 4 giờ ủ, Ab trần và các thể cộng hợp được bổ sung vào các tế bào tại 100µL mỗi giếng với các hiệu giá liều khác nhau. Tổng thể tích trong mỗi giếng khi bắt đầu nuôi cấy là 200µL. Các tế bào được ủ liên tục tại 37°C, CO₂ 5% trong 4 ngày trước khi đo các mức ATP tế bào. Để đánh giá sự ức chế phát triển tế bào, các mức ATP (là phép đo số lượng tế bào) được đánh giá qua sự phát quang bằng cách sử dụng kit thử nghiệm CellTiter-Glo.

Cả Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 đều ức chế sự phát triển tế bào của các tế bào 786-0 biểu hiện CD27L với nồng độ ức chế 50% (concentration of 50% inhibition, IC₅₀) như được trình bày trong Bảng 7. Tác dụng ức chế phát triển tế bào không quan sát thấy ở các tế bào H1650 âm tính CD27L khi tiếp xúc với Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1. Bổ sung lượng dư kháng thể kháng CD27L gốc không được cộng hợp có khả năng phong bế sự ức chế phát triển được trung gian bởi Ab4-MCC-DM1, khẳng định liên kết CD27L bởi Ab4-MCC-DM1 là bắt buộc đối với hoạt tính. Kháng thể kháng CD27L gốc không được cộng hợp không ức chế sự sinh trưởng của các tế bào 786-0 biểu hiện CD27L. Thể cộng hợp đối chứng MCC-DM1 kháng streptavidin (α SA-MCC-DM1), không biểu lộ sự ức chế bất kỳ sự phát triển tế bào ở dòng tế bào dương tính với CD27L

hoặc dòng tế bào âm tính với CD27L. Các kết quả chỉ ra là cả Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 đều là các chất ức chế hiệu quả sự phát triển tế bào 786-0 so với thể cộng hợp đối chứng (Fig. 3). Ab4-MCC-DM1 có chiều hướng thể hiện hiệu lực tăng nhẹ hơn Ab8-MCC-DM1 (Bảng 7).

Bảng 7. Hiệu lực Tế bào của các thể cộng hợp MCC-DM1 kháng CD27L

786-0-IC ₅₀	Ab4-MCC-DM1	Ab8-MCC-DM1
Nồng độ Thuốc (nM)	0,34	0,54
Nồng độ Kháng thể.	0,07	0,11

Khả năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity ADCC) được trung gian bởi Ab4-MCC-DM1 kháng các tế bào Raji với hiệu lực (EC₅₀ = 0,006µg/mL) và cường độ tương tự như được quan sát đối với kháng thể Ab4 kháng CD27L gốc không được cộng hợp (EC₅₀ = 0,01µg/mL). Vấn đề là, các tế bào sát thủ tự nhiên (Natural Killer, NK) được phân lập từ PBMC thu được từ người hiến máu bình thường được ủ với các tế bào đích Raji u lympho tế bào B ở người được đánh dấu bằng calcein (biểu hiện CD27L) khi có mặt Ab4-MCC-DM1 hoặc các kháng thể đối chứng như được mô tả trên đây. Phần trăm (%) tính gây độc tế bào đặc hiệu được xác định bằng cách đo sự giải phóng calcein từ các tế bào đích biểu hiện CD27L bị dung giải khi có mặt Ab4-MCC-DM1 như được so với các giếng đối chứng. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 8 mà biểu thị là mức ADCC được trung gian bởi Ab4-MCC-DM1 tương tự như mức của kháng thể Ab4 (các giá trị EC 50 là 0,006 và 0,01µg/mL tương ứng). Đối chứng huIgG1 không điều hòa sự dung giải bất kỳ có thể đo được của các đích biểu hiện CD27L. Cả Ab4-MCC-DM1 và kháng thể Ab4 không được cộng hợp có khả năng tạo ra ADCC được trung gian bởi tế bào NK của các đích đặc hiệu CD27L với các mức tương tự. Các kết quả tương tự được quan sát thấy đối với Ab8-MCC-DM1 và kháng thể Ab8 không được cộng hợp.

Hoạt tính thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP) in vitro của Ab4-MCC-DM1 hoặc kháng thể Ab4 gốc không được

cộng hợp được đo kháng cả các tế bào khối u Raji và 786-0. Ab4-MCC-DM1 điều hòa mức dung giải được trung gian bởi phân bổ sung tương tự mức được quan sát thấy đối với kháng thể Ab4 gốc không được cộng hợp. Vấn đề là, các đại thực bào được biệt hóa từ các bạch cầu đơn nhân được phân lập từ máu ngoại biên ở người thu được từ người cho máu bình thường. Các đại thực bào được ủ với các dòng tế bào 786-0 và Raji biểu hiện CD27L được đánh dấu màu xanh lá cây PHK67 làm các tế bào đích khi có mặt kháng thể kháng CD27L không được cộng hợp Ab4, HuIgG1, Ab4-MCC-DM1, hoặc các kháng thể đối chứng (α SA-MCC-DM1), như được mô tả trên đây. Phần trăm (%) tế bào khối u bị thực bào hóa được xác định từ phần trăm các tế bào khối u mà được nhận chìm bởi các đại thực bào so với tổng các đại thực bào ở các vùng được chọn. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 9 và biểu thị là Ab4-MCC-DM1 điều hòa hiệu lực ADCP tương tự ở các dòng tế bào biểu hiện CD27L, 786-0 và Raji. Các giá trị EC50 của Ab4 không được cộng hợp là trong phạm vi cao gấp 10 lần các giá trị được quan sát thấy đối với Ab4-MCC-DM1 (xem Bảng 8).

Bảng 8

	786-0	Raji
Các Ab	EC50 (pM)	EC50 (pM)
Ab4	0,008	0,008
Ab4-MCC-DM1	0,087	1,421

Dựa trên đường cong pha loãng được thực hiện tại các khoảng pha loãng 1:40, EC50 quan sát được đối với cả Ab4-MCC-DM1 và Ab4 không được cộng hợp có hiệu lực tương tự (trong giới hạn của hệ số pha loãng). Như vậy, cả các kháng thể Ab4-MCC-DM1 được cộng hợp và các kháng thể WT Ab4 không được cộng hợp đều có khả năng cảm ứng đại thực bào ở người để điều hòa ADCP của các tế bào biểu hiện CD27L với các mức tương tự. Các kết quả tương tự được quan sát thấy đối với kháng thể Ab8-MCC-DM1 và kháng thể Ab8 không được cộng hợp.

Hoạt tính in vitro gây độc tế bào phụ thuộc phần bổ sung (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) của Ab4-MCC-DM1 được đánh giá bằng cách sử dụng cả phần bổ sung của thỏ và của người và các tế bào khối u Raji biểu hiện CD27L. Tại nồng độ 10µg/mL, Ab4-MCC-DM1 điều hòa mức dung giải được trung gian bởi phần bổ sung tương tự với mức được quan sát thấy đối với kháng thể Ab4 gốc không được cộng hợp (độ dung giải 72% phần bổ sung của thỏ và độ dung giải 17% của người). Vấn đề là, phần bổ sung của thỏ được hoạt hóa hoặc phần bổ sung của người được hoạt hóa được ủ với các tế bào đích Raji biểu hiện CD27L khi có mặt các kháng thể kháng CD27L hoặc các kháng thể đối chứng, như được mô tả trên đây. Sự tiêu diệt được trung gian bởi CDC được đánh giá từ đặc điểm đầu ra của máy đọc ArrayScan “% các đối tượng được chọn” để phát hiện % của dương tính PI so với Hoechst đối với “% Gây độc tế bào.” Các kết quả biểu thị là Ab4-MCC-DM1 điều hòa các mức CDC tương tự như mức của kháng thể WT Ab4 khi ủ các tế bào khối u Raji với 10% phần bổ sung của thỏ non hoặc 20% phần bổ sung của người. Phần bổ sung của thỏ bị bất hoạt do nhiệt hoặc phần bổ sung của người bị bất hoạt do nhiệt không thể hiện khả năng tiêu diệt bất kỳ được trung gian bởi CDC kháng Raji. Như vậy, cả Ab4-MCC-DM1 và Ab4 không cộng hợp tạo ra mức hoạt tính CDC tương tự kháng các tế bào đích khối u biểu hiện CD27L. Các kết quả tương tự được quan sát thấy đối với kháng thể Ab8-MCC-DM1 và kháng thể Ab8 không được cộng hợp.

Dược lý học in vivo

Các tế bào 786-0 ccRCC (786-0 S4) được cấy chuyển in vivo được cấy vào các con chuột cái CB-17/ SCID bằng cách sử dụng MATRIGEL được giảm yếu tố sinh trưởng để tạo ra các khối u ghép ngoại lai cho các nghiên cứu về tính hiệu lực. Các tế bào 786-0 S4 biểu hiện trung bình khoảng 180.000 vị trí CD27L/tế bào. Việc điều trị bằng Ab4-MCC-DM1 hoặc Ab8-MCC-DM1 được bắt đầu khi kích thước khối u trung bình đạt đến khoảng 250mm³. Các động vật có khối u được chọn ngẫu nhiên theo kích thước khối u vào các nhóm mười động vật mỗi nhóm và dùng liều trong tĩnh mạch một lần. Nghiên cứu đáp ứng liều bị mù nghiên cứu về Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 sử dụng các liều nằm trong khoảng từ 7–64ug DM1/kg (0,3–2,5mg Ab/kg) được thực hiện trong mô hình khối u được thiết lập này. Sự thoái lui khối u mạnh được quan sát tại liều thấp 7ug DM1/kg, liều trung

bình 25ug DM1/kg và liều cao 64ug DM1/kg. Tại liều trung bình và liều cao, các sự thoái lui hoàn toàn được duy trì ít nhất là 28 ngày sau liều đơn (Fig. 4). Không quan sát thấy giảm thể trọng trong nhóm bất kỳ trong số các nhóm dùng liều trong suốt quá trình nghiên cứu.

Theo chứng minh khác về hiệu lực in vivo, các tế bào ccRCC Caki-1 mà biểu hiện trung bình 59.000 vị trí CD27L trên một tế bào (nhỏ hơn 3 lần ở các tế bào 786-0) được cấy vào các con chuột CB-17/SCID như được mô tả trên đây. Khi các mẫu ghép ngoại lai Caki-1 đạt đến kích thước trung bình là 250mm³, các động vật có khối u được chọn ngẫu nhiên theo kích thước khối u vào các nhóm mười động vật mỗi nhóm và dùng liều trong tĩnh mạch một lần một tuần trong 3 tuần (để bắt chước giống hơn phác đồ dùng liều lâm sàng theo tuần). Nghiên cứu đáp ứng liều bị mù nghiên cứu về Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 sử dụng các liều nằm trong khoảng từ 60–270ug DM1/kg (2,4–11mg Ab/kg) được thực hiện ở mô hình khối u được thiết lập này. Sự thoái lui khối u được quan sát thấy bắt đầu tại liều trung bình 120ug DM1/kg và tại liều cao 270ug DM1/kg trong khi tác dụng ức chế sự phát triển khối u được quan sát thấy tại liều thấp 60ug DM1/kg so với thể cộng hợp đối chứng hoặc chất dẫn. Khi thời gian tiến triển, sự thoái lui khối u trong hai nhóm liều cao hơn bắt đầu giảm trong vòng 7 ngày khi nhận liều cuối (Fig. 5).

Tương tự các tế bào ccRCC, các tế bào u lympho B Raji biểu hiện CD27L (khoảng 200.000 vị trí/tế bào) và nội bào hóa thể cộng hợp thuốc kháng CD27L dẫn đến dùng quá trình nguyên phân và tiêu diệt tế bào in vitro. Ab4-MCC-DM1 được đánh giá hiệu lực trong mô hình ghép ngoại lai Raji dưới da. Khi các ghép ngoại lai Raji đạt đến kích thước trung bình là 250mm³, các động vật có khối u được chọn ngẫu nhiên theo kích thước khối u vào các nhóm có mười động vật mỗi nhóm và được dùng liều trong tĩnh mạch q4 ngày x 2 và sau đó là một lần một tuần trong một thêm tuần cho tổng số 3 liều (để bắt chước giống hơn phác đồ dùng liều lâm sàng theo tuần). Nghiên cứu đáp ứng liều mù nghiên cứu về Ab4-MCC-DM1 bằng cách sử dụng các liều nằm trong khoảng từ 60–270ug DM1/kg (2,4–11mg Ab/kg) được thực hiện trong mô hình khối u được thiết lập này. Tác dụng ức chế sự phát triển khối u được quan sát thấy tại tất cả các mức liều dùng, tác dụng ức chế sự phát triển khối u >90% được quan sát thấy tại liều trung bình 120ug DM1/kg và liều cao 270ug

DM1/Kg trong thời gian dùng liều mạnh, có đáp ứng kháng khối u trung bình được quan sát tại liều thấp 60ug DM1/kg so với thể cộng hợp đối chứng (Fig. 6). Tại thời điểm cuối trong thời gian đo khối u, phần lớn một chút các động vật ở các nhóm liều trung bình và liều cao biểu lộ sự thoái lui khối u, gợi ý là sự tối ưu hóa thêm liều và phác đồ có thể làm tăng sự đáp ứng.

Hiệu quả của các khoảng thời gian dùng liều khác nhau của thể cộng hợp đối chứng α SA-MCC-DM1, hoặc Ab4-MCC-DM1 được đánh giá trong mô hình ghép ngoại lai 786-0. Các con chuột CB-17/SCID được cấy các tế bào khối u 786-0. Vào ngày 13, 50 các động vật được chọn ngẫu nhiên vào các nhóm có 10 động vật mỗi nhóm với thể tích khối u trung bình là 200mm³. Mỗi nhóm được dùng liều trong màng bụng của thể cộng hợp đối chứng α SA-MCC-DM1 hoặc Ab4-MCC-DM1. Thể tích khối u được thể hiện dưới dạng trung bình nhóm $\pm$ sai số chuẩn (SEM). Sự khác biệt có tính thống kê trong các sai khác được quan sát thấy giữa các đường cong sinh trưởng đánh giá từ ngày 13 đến ngày 59 bằng phân tích các phép đo lặp lại của hiệp phương sai (RMANOVA) của các dữ liệu thể tích khối u được chuyển đổi thành log với các so sánh nhiều biến được điều chỉnh Dunnett. Sự khác biệt có ý nghĩa thu được nếu $p < 0,05$. Ba mức liều lượng của Ab4-MCC-DM1 (1,0, 2,0, hoặc 2,9mg/kg của Ab4-MCC-DM1 dựa trên lần lượt kháng thể hoặc 25, 50, hoặc 75 μ g/kg dựa trên DM1 tương đương) được cho dùng. Liều 1,0mg/kg được dùng một lần một tuần hoặc 2 tuần một lần trong 6 tuần, liều 2,0 mg/kg được dùng 2 tuần một lần trong 6 tuần và liều 2,9mg/kg được dùng 3 tuần một lần trong 6 tuần. Các động vật được dùng liều trong màng bụng bắt đầu vào ngày 13 sau khi ghép khối u. Trước ngày 59, nhóm được điều trị bằng α SA-MCC-DM1 được cho chết êm ái do các thể tích khối u lớn. Vào ngày 59, thể tích khối u trung bình ở các chuột được điều trị bằng mỗi phác đồ liều dùng Ab4-MCC-DM1 là nhỏ hơn đáng kể so với thể tích khối u trung bình của nhóm thể cộng hợp đối chứng α SA-MCC-DM1 ($p < 0,0001$) (Fig. 7). Ab4-MCC-DM1 điều hòa sự thoái lui khối u lâu bền ở mỗi phác đồ liều dùng. Không quan sát thấy giảm thể trọng trong nhóm điều trị bất kỳ trong số các nhóm điều trị Ab4-MCC-DM1.

Dược động học

Các thể cộng hợp thuốc - kháng thể Ab4 và Ab8 được đánh giá sau khi dùng trong tĩnh mạch cho các chuột cái CB-17/SCID chứa các thể ghép ngoại lai 786-0 biểu hiện CD27L trong điều kiện các nghiên cứu về tính hiệu lực và nghiên cứu PK cuối sau đó. Các giá trị biểu hiện và thanh thải tích lũy là nằm trong phạm vi 1,33 và 1,4 lần giữa các phân tử Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1, và chu kỳ bán hủy của cả hai ADC là khoảng 12 ngày ở chuột.

Độ ổn định và các thông số PK của các thể cộng hợp thuốc - kháng thể Ab4-MCC-DM1 và Ab8-MCC-DM1 được mô tả đặc điểm *in vivo* sau liều đơn trong tĩnh mạch (intravenous, IV) ở các chuột CB-17/SCID có các thể ghép ngoại lai 786-0. Các biểu hiện của hai thể cộng hợp thuốc - kháng thể là có thể so sánh được ở mức độ cao, nhưng Ab4-MCC-DM1 đã chứng tỏ là có tỷ lệ cộng hợp thuốc với kháng thể ổn định hơn phân tử Ab8-MCC-DM1 trong suốt quá trình nghiên cứu 96 giờ như được xác định bằng ái lực-MS. Ab4-MCC-DM1 thể hiện không bị mất tính nguyên vẹn mà có thể phát hiện được của thể cộng hợp tại thời điểm 30 phút hoặc 24 giờ sau tiêm trong khi Ab8-MCC-DM1 biểu lộ các biến đổi tại thời điểm 30 phút và tất cả các loại của thể cộng hợp giảm đáng kể ở 24 giờ sau khi tiêm.

Ví dụ 3 - Lập bản đồ Paratop

Các biến đổi đối với Ab4 được thử nghiệm về sự liên kết với CD27L bằng ELISA. CD27L được liên kết với các đĩa Maxisorp tại nhiệt độ phòng trong > 2 giờ, lắc với 1 µg/mL trong 100 µL. Các đĩa sau đó được phong bế bằng 250 µL sữa khô không béo 10% trong PBS + Tween 20 0,05% trong 2 giờ. Sau khi rửa 4 x 300 µL PBS + Tween 20 0,05% (PBST), Ab biến đổi và các hiệu giá gốc đối chứng đã tinh chế nằm trong khoảng từ 0,045 đến 100 ng/mL được cho vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ. Peroxidaza cây cải ngựa cộng hợp với kháng thể phát hiện αHuFc (Jackson) được pha loãng 1:7000 được cho vào các đĩa sau khi rửa PBST thêm, và được ủ trong 1 giờ. Bước rửa cuối cùng được thực hiện và cơ chất TMB được ủ trong 10 phút và được dừng bằng axit phosphoric. Số đọc OD tại 450 nm được lấy và được vẽ đồ thị theo nồng độ. Các đường cong này sau đó được phân tích với độ khít

đường cong không tuyến tính 3 thông số và EC_{50} và tín hiệu Max được tính được so sánh với đối chứng đã tinh chế. Liên kết được xác định là tương tự với gốc nếu EC_{50} là gấp trong phạm vi 2 lần và tín hiệu Max lớn hơn 50%. Liên kết bị giảm nếu EC_{50} tăng hơn 2 lần và/hoặc tín hiệu max nhỏ hơn 50%. Liên kết bị loại bỏ nếu không thể tạo ra đường cong hoặc tín hiệu max nhỏ hơn 5%.

Bảng 8: Các tổ hợp của các biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liệt kê với các mức biểu hiện của chúng ở $\mu\text{g/mL}$ (được xác định bằng định lượng ForteBio Protein A) cùng với ảnh hưởng của chúng đối với liên kết.

Các dạng phối hợp	Biểu hiện	Liên kết
N31H-Y58N + N31S-I34M	30,3	Giảm
N31H-Y58N + G33S-I34L	46,7	Loại bỏ
N31H-Y58N + D54E-G55S	9,91	Loại bỏ
N31H-Y58N + S103G-G104S	14,6	Loại bỏ
N31H-Y58N + HC Gốc	10,4	Giảm
R24K-S26G + N31S-I34M	13,8	Tương tự
R24K-S26G + G33S-I34L	16,9	Loại bỏ
R24K-S26G + D54E-G55S	1,87	Giảm
R24K-S26G + S103G-G104S	3,76	Giảm
R24K-S26G + HC Gốc	3,43	Tương tự
L55I-Y58F + N31S-I34M	9,53	Giảm
L55I-Y58F + G33S-I34L	11,6	Loại bỏ
L55I-Y58F + D54E-G55S	1,26	Giảm
L55I-Y58F + S103G-G104S	2,61	Giảm
L55I-Y58F + HC Gốc	2,72	Tương tự
Q95N-T96S + N31S-I34M	24,6	Tương tự
Q95N-T96S + G33S-I34L	32,7	Loại bỏ
Q95N-T96S + D54E-G55S	1,89	Giảm
Q95N-T96S + S103G-G104S	4,99	Loại bỏ

Q95N-T96S + HC Gốc	5,85	Tương tự
LC Gốc + N31S-I34M	31,6	Giảm
LC Gốc + G33S-I34L	51,2	Loại bỏ
LC Gốc + D54E-G55S	7,03	Giảm
LC Gốc + S103G-G104S	10,7	Loại bỏ
LC Gốc + HC Gốc	9,25	Tương tự

13 trong số 24 tổ hợp biến đổi được tạo ra đối với Ab4 giữ lại mức liên kết nào đó với CD27L. 9 tổ hợp không liên kết với CD27L có ít nhất một trong số các biến đổi sau: các biến đổi chuỗi nặng “G33S-I34L” và “S103G-G104S” hoặc biến đổi chuỗi nhẹ “N31H-Y58N”. Trong số các kháng thể tương tự 97% (2 sự biến đổi axit amin) có 75% (6 trong số 8) giữ lại mức liên kết nào đó, trong khi 56% (7 trong số 16) trong số các kháng thể tương tự 94% (4 sự biến đổi axit amin) giữ lại mức liên kết nào đó, 2 trong số đó có mức liên kết tương tự như đối chứng gốc được tinh chế. Điều này thể hiện là kháng thể có mức tương tự thấp như 94% so với Ab4 vẫn có thể liên kết với CD27L.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO:1

Trình tự axit amin CD27L ở người

MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPL
 ESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIY
 MVHIQVTLAICSSTTASRHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPL
 ARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

SEQ ID NO:2

Trình tự axit amin tiền chất CD27L ở người

MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTF
 LVKDCDQHRKAAQCDCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAE
 CACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTA
 GHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQ
 RRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

SEQ ID NO:3

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab1

CAGATGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACA
 GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGATGGCTCCATCATCAGTGGTGTTT
 ACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGG
 ATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTCCTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
 CTTACCATGTGTCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTC
 TGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGAGTGGATACAGC
 TATGCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC
 TAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT

CTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
 GGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
 CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
 GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
 CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
 ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
 TCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
 GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
 AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
 AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC
 CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
 A

SEQ ID NO:4

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab2

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAG
 ACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGACTCCATCATCAGTGGTGGTTA
 CTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGG
 TACATCTTTTACAGTGGGAGCACCGACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAG
 TTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCT
 GTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGGAGTGGATACAGCT

ATGCCCTCTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCT
 AGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
 TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
 CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
 CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
 CTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
 AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
 GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
 GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
 ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC
 TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG
 ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:5

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab4

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCA
 TAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT
 ATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
 ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC

TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGAGGATATAG
 TGGCTACGATTCGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
 TCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
 GAGCACCTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
 CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC
 ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
 GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA
 ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
 GTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
 ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
 AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCA
 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
 CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
 CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
 CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
 CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCA
 CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGTAATGA

SEQ ID NO:6

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
 CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGTTATGATA
 TCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGAT

GAACCCTAACAGTGGTAACACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC
 ACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTACGATTTTTG
 GAGTGGTTATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
 ACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
 ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
 AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGA
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACACCCAGACCTACA
 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
 AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
 ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
 ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
 GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
 CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
 CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
 CTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO:7

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab6

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCC
TCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTAT
CAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
AGCGCTTACAATGGTTACACACACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCA
CCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCT
GAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACTACGGTGGTAAC
GACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAG
CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA
CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC
ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG
ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA
CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAATGA

SEQ ID NO:8

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab7

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTACCTATGGCA
 TGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT
 ATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
 ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAACAGTCACTA
 CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 GCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA
 CCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
 ACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCC
 TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC
 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC
 AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
 AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
 CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTC
 CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
 AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC
 CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

A

SEQ ID NO:9

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab8

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCA
 TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT
 ATGGTATGATGGAAGTGATAAATACTTTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
 ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGATAGCAG
 GAGCTCGCTACGTCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
 CTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT
 CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
 CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
 GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
 AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
 TGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
 CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
 GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA
 CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTC
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
 TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
 GGGTAAA

SEQ ID NO:10

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab1

QMQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIISGVYYWSWIRQHPGKGLEWI
GYIYYSGSTSYNPSLKSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSY
ALFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:11

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab2

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSIISGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG
YIFYSGSTDYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSYAL
FDHWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:12

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab4

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVA
 VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGY
 SGYDSGFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:13

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWM
 GWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARGYD
 FWSGYYYYYYYGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:14

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWM
 GWISAYNGYTHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDY
 GGNDYYGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY

FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:15

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab7

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWV
 AVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNS
 HYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:16

Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab8

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV
 AVIWYDGS DKYFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGI
 AGARYVYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW

LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:17

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab1

QMQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIISGVYYWSWIRQHPGKGLEWI
 GYIYYSGSTSYNPSLKSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSY
 ALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:18

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab2

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSIISGGYYWSWIRQHPGKGLEWIG
 YIFYSGSTDYNPSLKSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSYAL
 FDHWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:19

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab3

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 VISDSGGTTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDYSN
 RYYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:20

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab4

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVA
 VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGY
 SGYDSGFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:21

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWM
 GWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARGYD
 FWSGYYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:22

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWM
 GWISAYNGYTHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDY
 GGNDYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:23

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab7

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWV
 AVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNS
 HYYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:24

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab8

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV
AVIWYDGSCKYFADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGI
AGARYVYFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:25

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab1

SGVYYWS

SEQ ID NO:26

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab2

SGGYWS

SEQ ID NO:27

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab3

SYAMS

SEQ ID NO:28

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab4

NYGIH

SEQ ID NO:29

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab5

SYDIN

SEQ ID NO:30

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab6

SYGIS

SEQ ID NO:31

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab7

TYGMH

SEQ ID NO:32

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab8

SYGMH

SEQ ID NO:33

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab1

YIYYSGSTSYNPSLKS

SEQ ID NO:34

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab2

YIFYSGSTDYNPSLKS

SEQ ID NO:35

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab3

VISDSGGTTDYADSVKG

SEQ ID NO:36

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab4

VIWYDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO:37

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab5

WMNPNSGNTGYAQKFQG

SEQ ID NO:38

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab6

WISAYNGYTHYAQKLQG

SEQ ID NO:39

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab7

VIWYDGSNKYYGDSVKG

SEQ ID NO:40

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab8

VIWYDGSDKYFADSVKG

SEQ ID NO:41

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab1

SGYSYALFDY

SEQ ID NO:42

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab2

SGYSYALFDH

SEQ ID NO:43

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab3

HDYSNRYYFDY

SEQ ID NO:44

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab4

DGGYSGYDSGFDY

SEQ ID NO:45

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab5

GYDFWSGYYYYYYGMDV

SEQ ID NO:46

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab6

DYGGNDYYGMDV

SEQ ID NO:47

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab7

DNSHYYYGMDV

SEQ ID NO:48

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab8

DGIAGARYVYFDY

SEQ ID NO:49

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTTTAGGAG
ACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCGTTGACAGATATTTCAA
TTGGTATCAGCAGAAACCTGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTTTGCTGCA
TCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCGGTGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTAC
TACTGTCAACAGAGCTACAGTACCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGG
TGGAAGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:50

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab2

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
 ACAGAGTCACCATCAGTTGCCGGGCAAGTCAGTTCATTGGCAGATATTTCAA
 TTGGTATCAGCAGCAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGAA
 TCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA
 CAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAAGATA
 CTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG
 GTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
 TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
 TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
 CAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
 AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG
 AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:51

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab4

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAG
 AGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGAATAGTAATGG
 ATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGTTC
 CTGATCTATTTGGGTTCTTATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGG
 CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG
 GATGTTGGGGTTTATTACTGTATACAAACTCTACAAACTCCATTCACTTTCGG
 CCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
 ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG
 CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
 AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC

TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:52

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab5

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCTGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTT
AGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT
GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTG
GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT
GTATTACTGTCTGCAGTCTGGTAGCTCTGTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA
CCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

SEQ ID NO:53

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab6

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAG
AGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAATTAATTATGT
ATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGG
AGTGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTG
GCACCTCAGCCTCCCTGGCCCTCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGA
TTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGTGGTGTTCGGCGGA

GGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGCCAACCGAAAGCGGGCGCCCTCGGTCACTC
 TGTTCCTCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGT
 CTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATA
 GCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCA
 ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA
 GTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGA
 GAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATAG

SEQ ID NO:54

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab7

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAG
 AGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATG
 ATGTAAATTGGTATCAGCAGTTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTAT
 GTTAACAACAATCGGCCCTCAGGAGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCACGTC
 TGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGACTCCAGGCTGAGGATGAGGCT
 GATTATTACTGCCAGTCCTATGACACCAGCCTGAGTGCTTCGGTATTCGGCGG
 AGGGACCAGACTGACCGTCCTAGGCCAACCGAAAGCGGGCGCCCTCGGTCACT
 CTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT
 GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA
 TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAG
 CAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG
 AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG
 GAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:55

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
 ACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGC
 CTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCA
 TCCAGTTTGCAAGGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA
 CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT
 TACTGCCAACAATATTATAATTACCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCACAGT
 GGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
 ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
 GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
 GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
 TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
 CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:56

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab1

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSVDRYFNWYQQKPGKAPKVLIFAA
 SSLQSGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEV
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:57

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQFIGRYFNWYQQQPGKAPKVLIIYAE
 SSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFARYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:58

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab4

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQF
LIYLGSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCIQTLQTPFTFGPGT
KVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

SEQ ID NO:59

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab5

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYG
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCLQSGSSVPLTFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:60

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab6

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGINYVYWYQQLPGTAPKLLIYRS
DQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLALSGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTK
LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:61

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab7

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVNWWYQQFPGTAPKLLIY
 VNNNRPSGVPDFSGSTSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDTLSLASVFGGGT
 RLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
 AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE
 CS

SEQ ID NO:62

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAA
 SSLQGGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYNYPFTFGPGTTVDIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:63

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab1

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSVDRYFNWYQQKPGKAPKVLIFAA
 SSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEV
 K

SEQ ID NO:64

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQFIGRYFNWYQQQPGKAPKVLIIYAE
 SSLQSGVPSRFGSGSGSGTEFTLTISLQPEDFARYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:65

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab3

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSFSSNYLAWYQQKPGQAPRLFIYG
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGISPCSFQGGTKLEIK

SEQ ID NO:66

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab4

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQF
LIYLGSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCIQTLQTPFTFGPGT
KVDIK

SEQ ID NO:67

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab5

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYG
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCLQSGSSVPLTFGGGKVEI
K

SEQ ID NO:68

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab6

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGINYVYWYQQLPGTAPKLLIYRS
DQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLALSGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTK
LTVL

SEQ ID NO:69

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab7

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVNWWYQQFPGTAPKLLIY
VNNNRPSGVDPDRFSGTSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDTLSASVFGGGT

RLTVL

SEQ ID NO:70

Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAA
 SSLQGGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYNYPFTFGPGTTVDIK

SEQ ID NO:71

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab1

RASQSVDRYFN

SEQ ID NO:72

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab2

RASQFIGRYFN

SEQ ID NO:73

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab3

RASQSFSSNYLA

SEQ ID NO:74

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab4

RSSQSLNSNGYNYLD

SEQ ID NO:75

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab5

RASQSVSSSYLA

SEQ ID NO:76

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab6

SGSSSNIGINYVY

SEQ ID NO:77

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab7

TGSSSNIGAGYDVN

SEQ ID NO:78

Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab8

RASQGISNYLA

SEQ ID NO:79

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab1

AASSLQS

SEQ ID NO:80

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab2

AESSLQS

SEQ ID NO:81

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab3

GASSRAT

SEQ ID NO:82

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab4

LGSYRAS

SEQ ID NO:83

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab5

GASSRAT

SEQ ID NO:84

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab6

RSDQRPS

SEQ ID NO:85

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab7

VNNNRPS

SEQ ID NO:86

Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab8

AASSLQG

SEQ ID NO:87

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab1

QQSYSTPWT

SEQ ID NO:88

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab2

QQSYSTPWT

SEQ ID NO:89

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab3

QQYGISPCS

SEQ ID NO:90

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab4

IQTLQTPFT

SEQ ID NO:91

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab5

LQSGSSVPLT

SEQ ID NO:92

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab6

AAWDDSLSGVV

SEQ ID NO:93

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab7

QSYDTSLSASV

SEQ ID NO:94

Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab8

QQYYNYPFT

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein liên kết kháng nguyên CD27L chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng, trong đó:

a) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:71; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:79; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:87; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:25; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:33; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:41;

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:72; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:80; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:88; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:26; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:34; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:42;

c) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:73; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:81; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:89; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:27; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:35; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:43;

d) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:74; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:82; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:90; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:28; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:36; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:44;

e) miền biến đổi chuỗi nhẹ như được xác định trong d) nhưng có đột biến R24K-S26G, và miền biến đổi chuỗi nặng như được xác định trong d) nhưng có đột biến N31S-I34M;

f) miền biến đổi chuỗi nhẹ như được xác định trong d) nhưng có đột biến R24K-S26G, và miền biến đổi chuỗi nặng như được xác định trong d);

g) miền biến đổi chuỗi nhẹ như được xác định trong d) nhưng có đột biến L55I-Y58F, và miền biến đổi chuỗi nặng như được xác định trong d);

h) miền biến đổi chuỗi nhẹ như được xác định trong d) nhưng có đột biến Q95N-T96S, và miền biến đổi chuỗi nặng như được xác định trong d) nhưng có đột biến N31S-I34M;

i) miền biến đổi chuỗi nhẹ như được xác định trong d) nhưng có đột biến Q95N-T96S, và miền biến đổi chuỗi nặng như được xác định trong d);

j) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:75; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:83; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:91; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:29; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:37; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:45;

k) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:76; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:84; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:92; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:30; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:38; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:46;

l) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:77; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:85; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:93; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:31; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:39; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:47; hoặc

m) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:78; trình tự LCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:86; và trình tự LCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:94; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1 được trình bày trong SEQ ID NO:32; trình tự HCDR2 được trình bày trong SEQ ID NO:40; và trình tự HCDR3 được trình bày trong SEQ ID NO:48.

2. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 hoặc SEQ ID NO:70.

3. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 1 hoặc 2, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24.

4. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 1, chứa:

a) miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá mười sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 hoặc SEQ ID NO:70;

b) miền biến đổi chuỗi nặng có không quá mười sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24; hoặc

c) miền biến đổi chuỗi nhẹ của a) và miền biến đổi chuỗi nặng của b).

5. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 4, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 hoặc SEQ ID NO:70.

6. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 4 hoặc 5, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có không quá năm sự chèn thêm, cắt bỏ hoặc thế axit amin từ trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24.

7. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID

NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 hoặc SEQ ID NO:70.

8. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-7, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24.

9. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó

a) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 63, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 17;

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 64, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 18;

c) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 65, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 19;

d) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 66, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 20;

e) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 67, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 21;

f) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 68, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 22;

g) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 69, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 23; hoặc

h) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 70, và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO: 24.

10. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó protein liên kết kháng nguyên này ức chế sự liên kết của CD27L với CD27.

11. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể.

12. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 11, trong đó kháng thể này là kháng thể người.

13. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:56 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:10.

14. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:57 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:11.

15. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:58 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:12.

16. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:59 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:13.

17. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:60 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:14.

18. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:61 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:15.

19. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 12, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID:62 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được trình bày trong SEQ ID NO:16.

20. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, đặc trưng ở chỗ protein liên kết kháng nguyên CD27L là kháng thể đặc hiệu kép.

21. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 20, đặc trưng ở chỗ, kháng thể đặc hiệu kép này liên kết với CD27L và kháng nguyên tế bào yếu tố tác động ở người mà là CD3.

22. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, đặc trưng ở chỗ, protein liên kết kháng nguyên CD27L là đoạn kháng thể.

23. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 22, đặc trưng ở chỗ, đoạn kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm F(ab), đoạn Fab gồm các miền VL, VH, CL và CH1, F(ab'), F(ab')₂, Fv, đoạn Fv gồm các miền VL và VH của kháng thể đơn, đoạn dAb, phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), dime Fv chuỗi đơn đặc hiệu kép, kháng thể dime và kháng thể trime.

24. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó protein liên kết kháng nguyên CD27L này được cộng hợp với chất hóa trị liệu.

25. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 24, trong đó cầu nối cộng hợp chất hóa trị liệu với protein liên kết kháng nguyên CD27L.

26. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 25, trong đó cầu nối này là cầu nối không phân cắt được.

27. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 26, trong đó cầu nối này chứa MCC.

28. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 25 đến 27, trong đó chất hóa trị liệu này được cộng hợp với một hoặc nhiều lysin được chứa trong polypeptit của protein liên kết kháng nguyên CD27L.

29. Protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 28, trong đó chất hóa trị liệu này là DM1.

30. Chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L như được xác định trong điểm 29, trong đó số lượng phân tử DM1 trung bình trên một protein liên kết kháng nguyên CD27L là nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

31. Chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 30, trong đó số lượng phân tử DM1 trung bình trên một protein liên kết kháng nguyên CD27L là nằm trong khoảng từ 3 đến 7.

32. Chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 31, trong đó số lượng phân tử DM1 trung bình trên một protein liên kết kháng nguyên CD27L là nằm trong khoảng từ 4 đến 6.

33. Chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 31, trong đó số lượng phân tử DM1 trung bình trên một protein liên kết kháng nguyên CD27L là 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 hoặc 6,0.

34. Chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 33, trong đó chế phẩm này là dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết kháng nguyên CD27L.

35. Chế phẩm protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm 34, trong đó dược phẩm này được đông khô.

36. Axit nucleic được phân lập mã hóa một hoặc nhiều thành phần polypeptit của protein liên kết kháng nguyên CD27L chứa:

i) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:71; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:79; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:87; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình

tự được trình bày trong SEQ ID NO:25; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:33; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:41;

ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:72; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:80; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:88; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:26; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:34; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:42;

iii) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:73; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:81; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:89; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:27; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:35; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:43;

iv) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:74; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:82; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:90; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:28; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:36; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:44;

v) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ được xác định trong iv) nhưng có đột biến R24K-S26G, đột biến L55I-Y58F hoặc đột biến Q95N-T96S; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng được xác định trong iv) nhưng có đột biến N31S-I34M;

vi) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:75; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:83; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:91; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:29; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:37; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:45;

vii) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:76; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:84; và LCDR3 có trình tự

được trình bày trong SEQ ID NO:92; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:30; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:38; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:46;

viii) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:77; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:85; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:93; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:31; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:39; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:47; hoặc

ix) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:78; LCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:86; và LCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:94; và miền biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:32; HCDR2 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:40; và HCDR3 có trình tự được trình bày trong SEQ ID NO:48.

37. Axit nucleic được phân lập theo điểm 36, trong đó polypeptit chứa chuỗi nhẹ kháng thể.

38. Axit nucleic được phân lập theo điểm 37, trong đó chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 hoặc SEQ ID NO:55.

39. Axit nucleic được phân lập theo điểm 38, trong đó chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 hoặc SEQ ID NO:55.

40. Axit nucleic được phân lập theo điểm 39, trong đó chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic chứa trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 hoặc SEQ ID NO:55.

41. Axit nucleic được phân lập theo điểm 36, trong đó polypeptit chứa chuỗi nặng kháng thể.
42. Axit nucleic được phân lập theo điểm 41, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.
43. Axit nucleic được phân lập theo điểm 42, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.
44. Axit nucleic được phân lập theo điểm 43, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic chứa trình tự nucleotit được trình bày trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:9.
45. Vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 44.
46. Vector biểu hiện theo điểm 45, trong đó axit nucleic được phân lập mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể.
47. Vector biểu hiện theo điểm 45, trong đó axit nucleic được phân lập mã hóa chuỗi nặng kháng thể.
48. Vector biểu hiện theo điểm 46, trong đó vector này còn chứa axit nucleic được phân lập mã hóa chuỗi nặng kháng thể.
49. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 36 đến 44 được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.
50. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện theo điểm 46 hoặc 47.
51. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 50, trong đó tế bào chủ này chứa vector biểu hiện theo điểm 46 hoặc 47.

52. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 51, trong đó tế bào chủ tái này tiết kháng thể mà liên kết với CD27L.

53. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 49 đến 52, trong đó tế bào này có nguồn gốc từ động vật có vú.

54. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 53, trong đó tế bào này là dòng tế bào ở buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).

55. Phương pháp bào chế thể cộng hợp thuốc - kháng thể CD27L, phương pháp này bao gồm các bước:

a) cung cấp protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23;

b) cộng hợp protein liên kết kháng nguyên CD27L với cầu nối; và

c) cộng hợp thuốc với cầu nối này.

56. Phương pháp bào chế thể cộng hợp thuốc - kháng thể CD27L, phương pháp này bao gồm các bước:

a) cung cấp protein liên kết kháng nguyên CD27L theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23; và

b) cộng hợp cầu nối đã được liên kết cộng hóa trị với thuốc với protein liên kết kháng nguyên CD27L đã nêu.

57. Phương pháp theo điểm 55 hoặc 56, trong đó protein liên kết kháng nguyên CD27L này là kháng thể.

58. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:63 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:17.

59. Phương pháp theo điểm 58, trong đó kháng thể này là Ab1.

60. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:64 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:18.

61. Phương pháp theo điểm 60, trong đó kháng thể này là Ab2.

62. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:65 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:19.

63. Phương pháp theo điểm 62, trong đó kháng thể này là Ab3.

64. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:66 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:20.

65. Phương pháp theo điểm 64, trong đó kháng thể này là Ab4.

66. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:67 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:21.

67. Phương pháp theo điểm 66, trong đó kháng thể này là Ab5.

68. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:68 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:22.

69. Phương pháp theo điểm 68, trong đó kháng thể này là Ab6.

70. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:69 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:23.

71. Phương pháp theo điểm 70, trong đó kháng thể này là Ab7.

72. Phương pháp theo điểm 57, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ được trình bày trong SEQ ID NO:70 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng được trình bày trong SEQ ID NO:24.

73. Phương pháp theo điểm 72, trong đó kháng thể này là Ab8.

74. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 55 đến 73, trong đó cầu nối này chứa MCC.

75. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 55 đến 74, trong đó thuốc này chứa DM1.

	Epitop chứa	Ái lực của Hu Biacore K _D nM	Hào tính của tế bào tự nhiên ECD 50nM	Hào tính của cyno ECD 50nM	ADCC EC50 nM	ADCP EC50 pM	CDC # EC50 nM	Nội bào hóa T ½ (giờ)
Kháng thể thể khảm ở chuột kháng CD27L ở người	3	1,25	0,60	2,22	0,195	2,17	2,64	0,41
Ab1	1	0,62	0,32	0,05	0,021	1,12	1,0	1,03
Ab2	1	0,59	0,24	0,24	0,034	1,19	1,17	0,69
Ab3	1	4,35	4,18	2,80	0,715	64,8	10,6	0,49
Ab4	3	3,05	0,25	0,48	0,332	1,55	1,54	0,30
Ab5	2	10,4	0,66	1,40	0,422	2,36	5,28	0,75
Ab6	4	6,06	0,87	0,87	0,167	1,88	4,20	1,08
Ab7	4	9,71	0,18	0,43	0,076	0,80	0,64	0,43
Ab8	2	10,8	0,09	0,34	> 67	1,60	> 67	1,81

FIG. 1

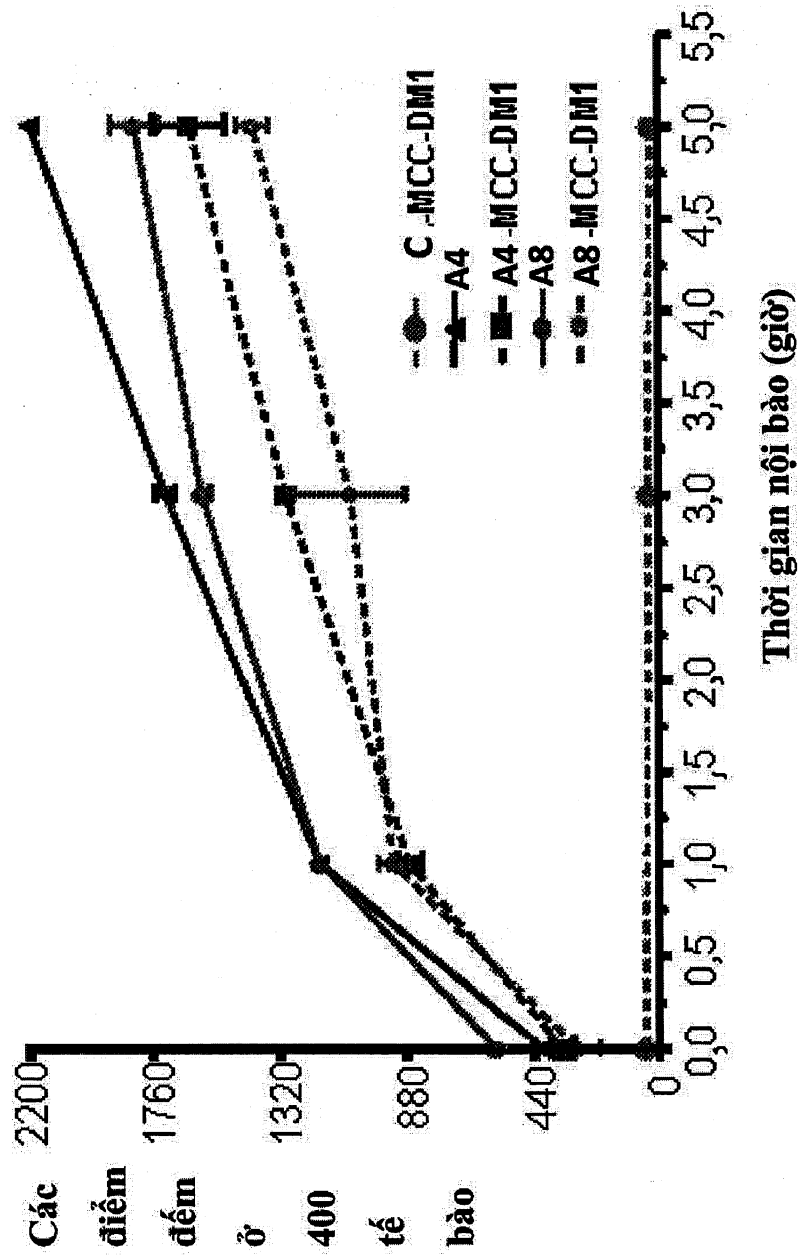


FIG. 2

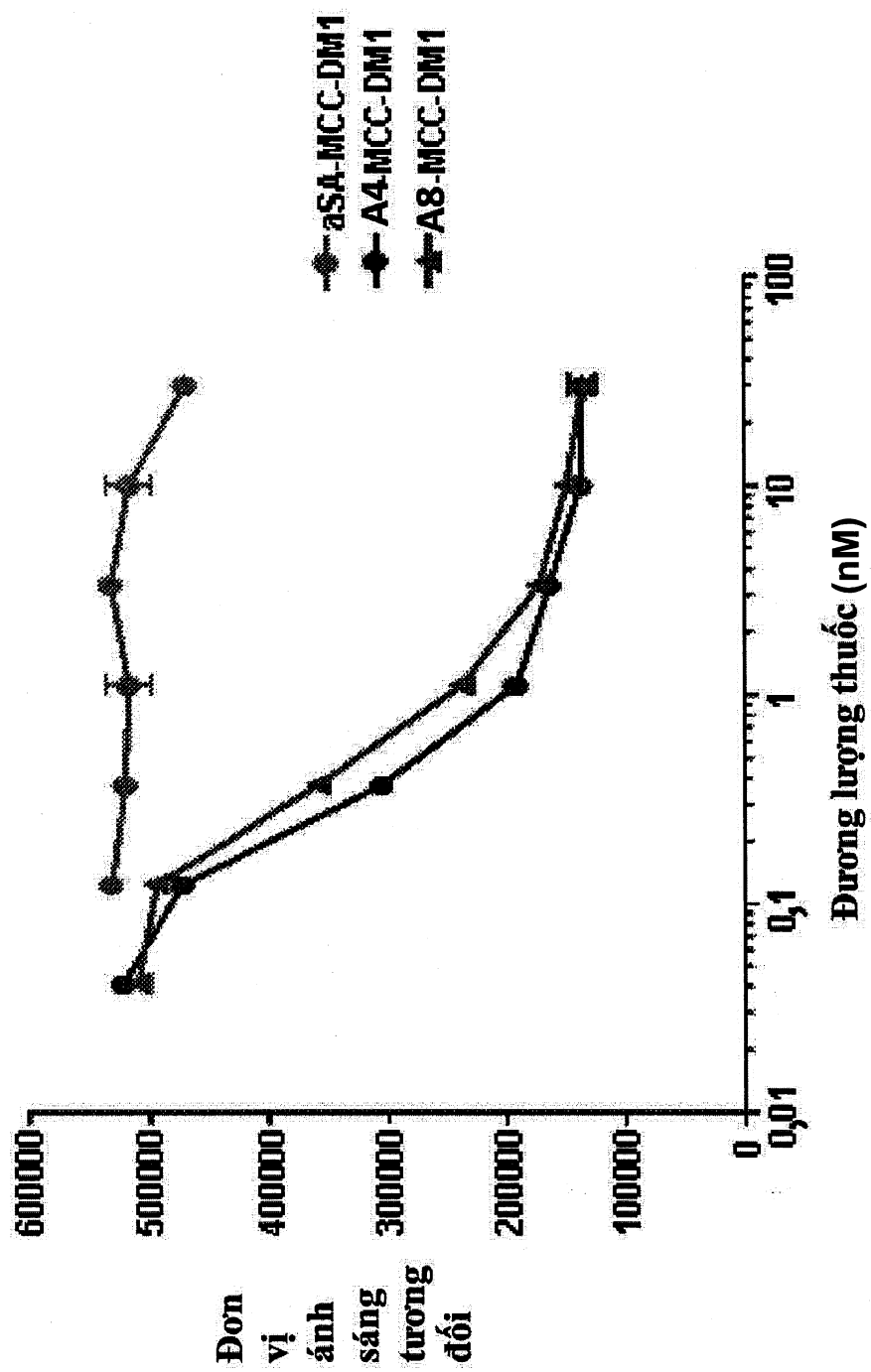


FIG. 3

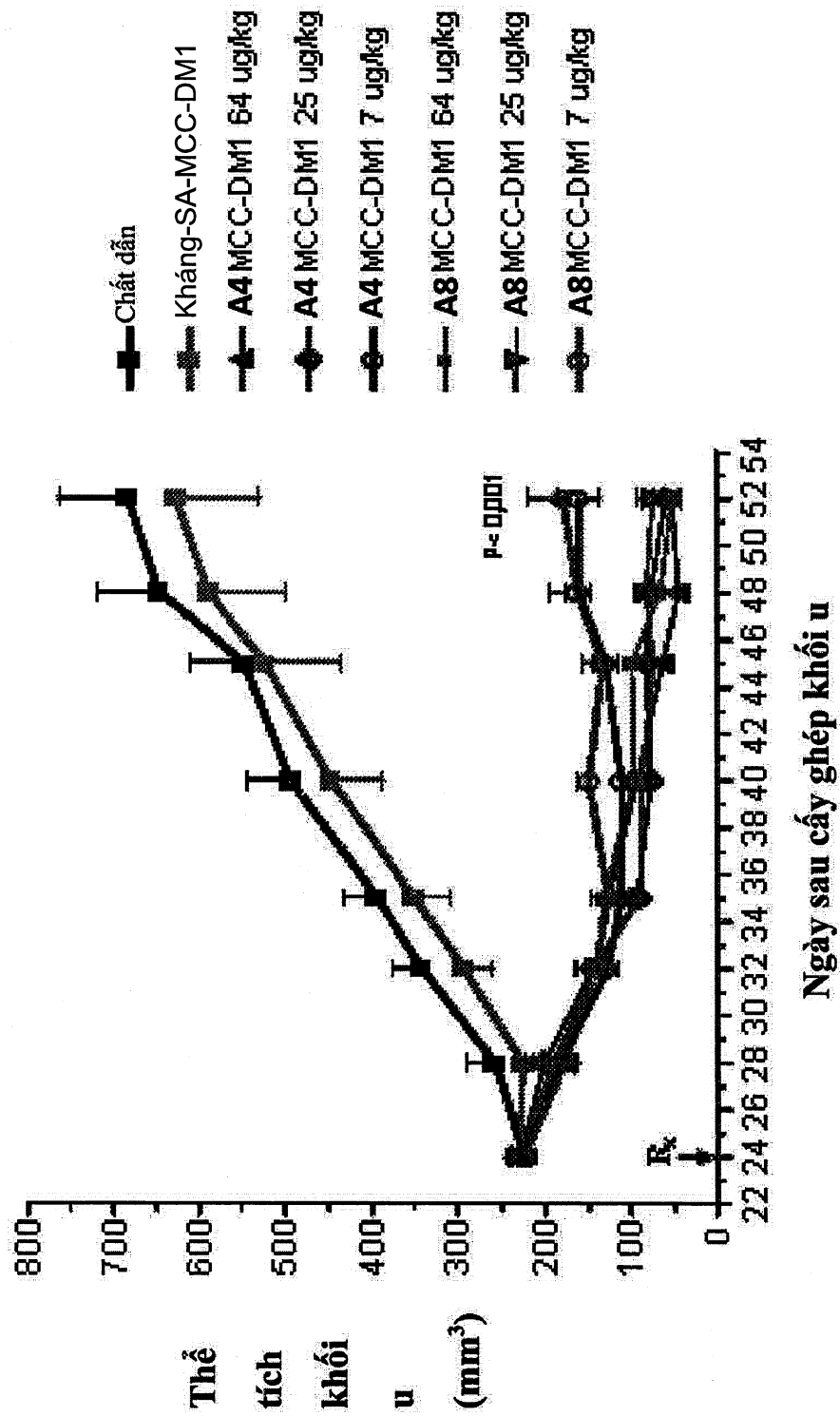


FIG. 4

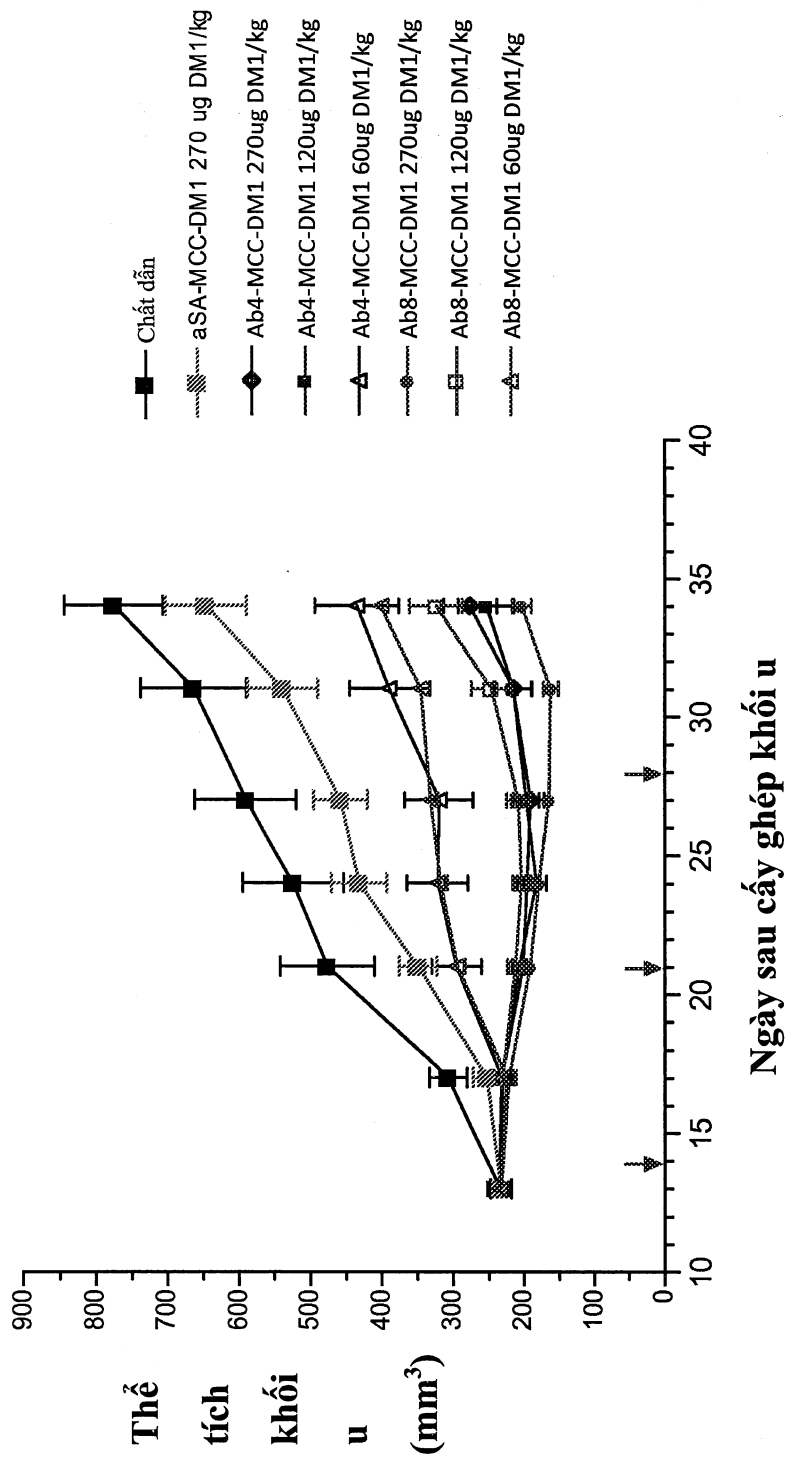


FIG. 5

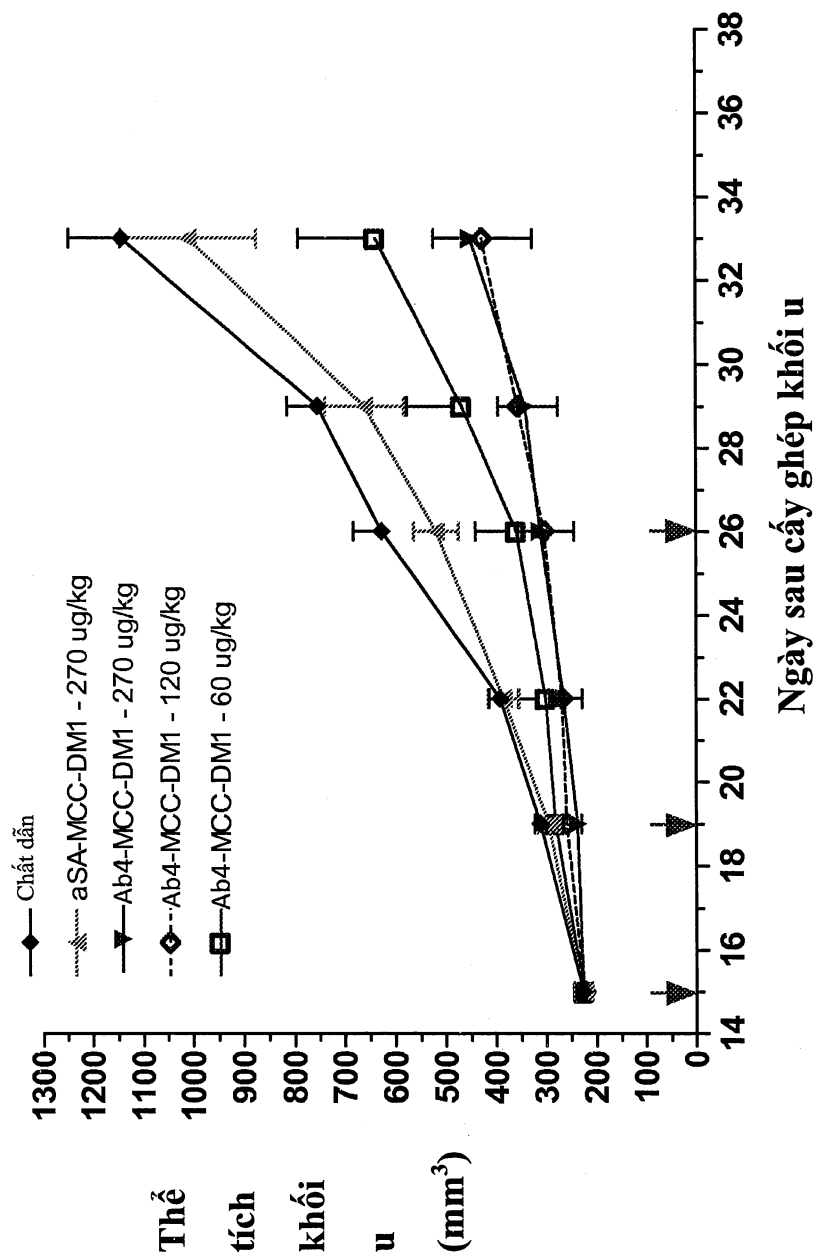


FIG. 6

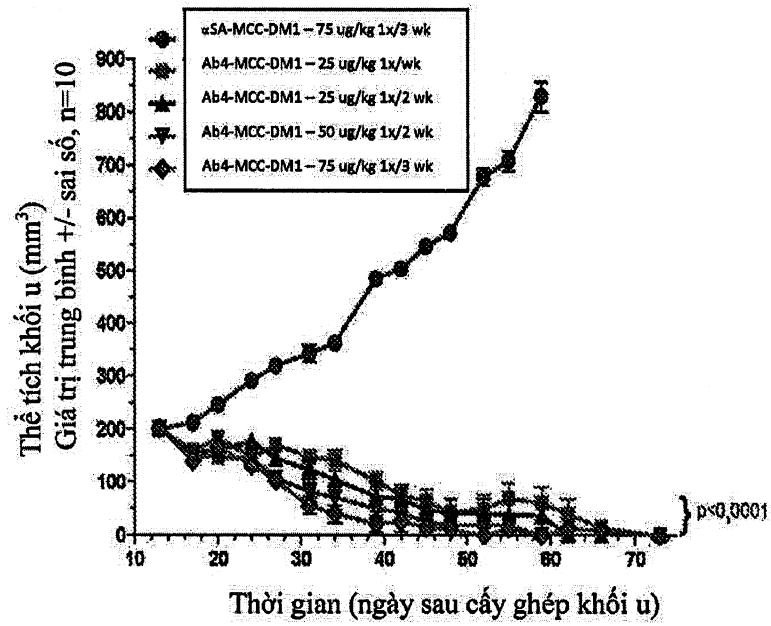


FIG. 7

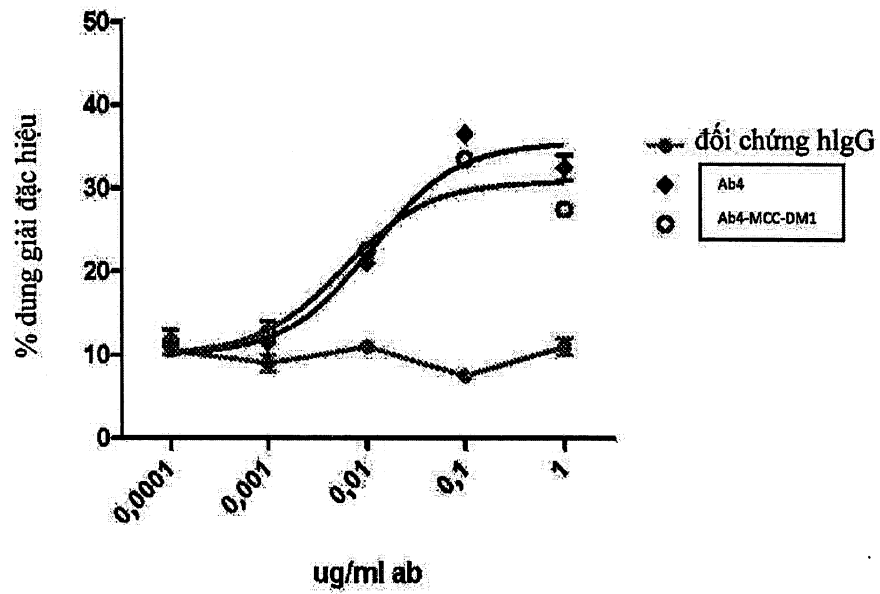


FIG. 8

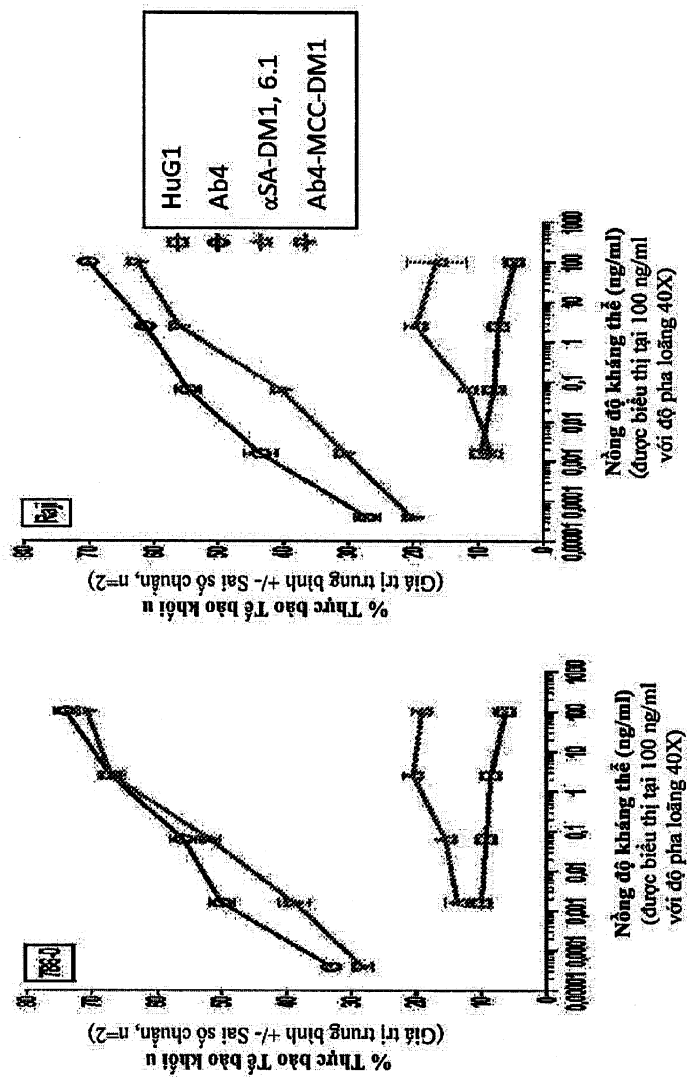
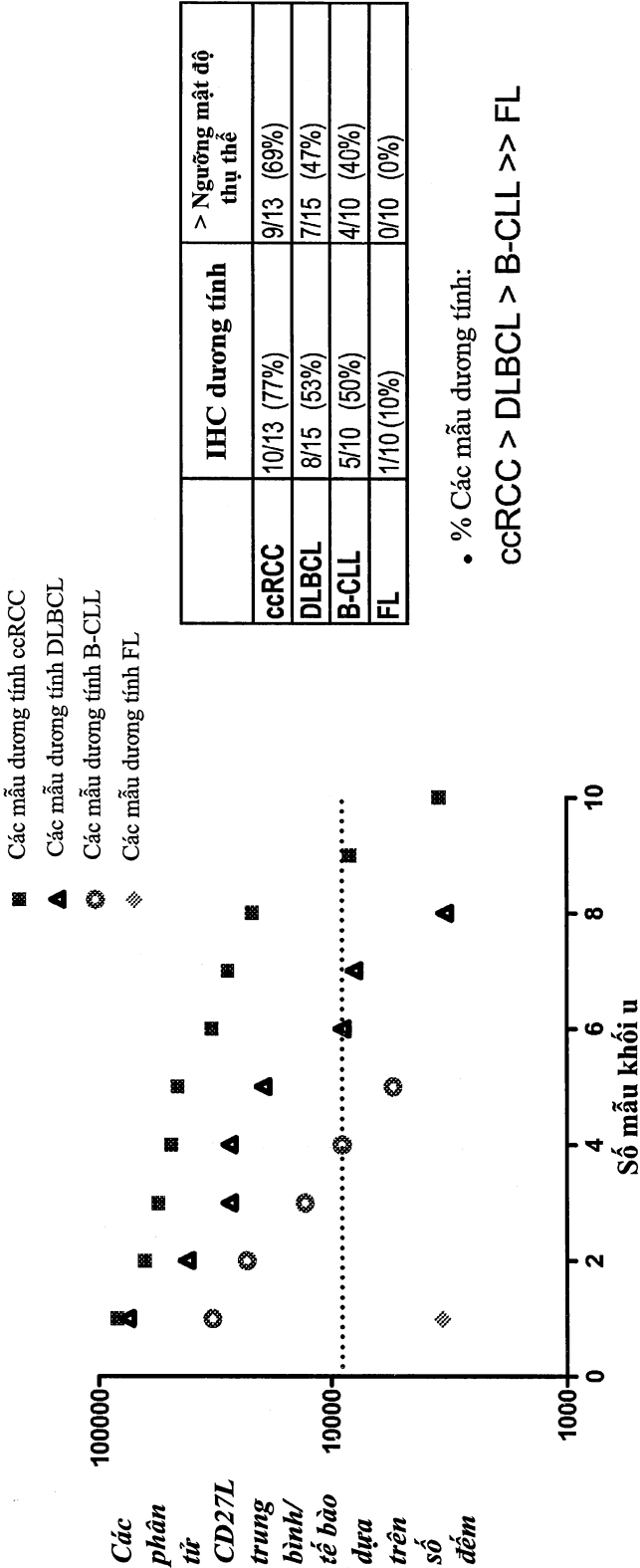


FIG. 9

So sánh biểu hiện CD27L (vị trí ước tính/tế bào) đối với các mẫu khối u đông lạnh sơ cấp mà đạt điểm dương theo IHC được che phủ



9000 vị trí trên mỗi tế bào in vitro cần cho cho độ nhạy.....

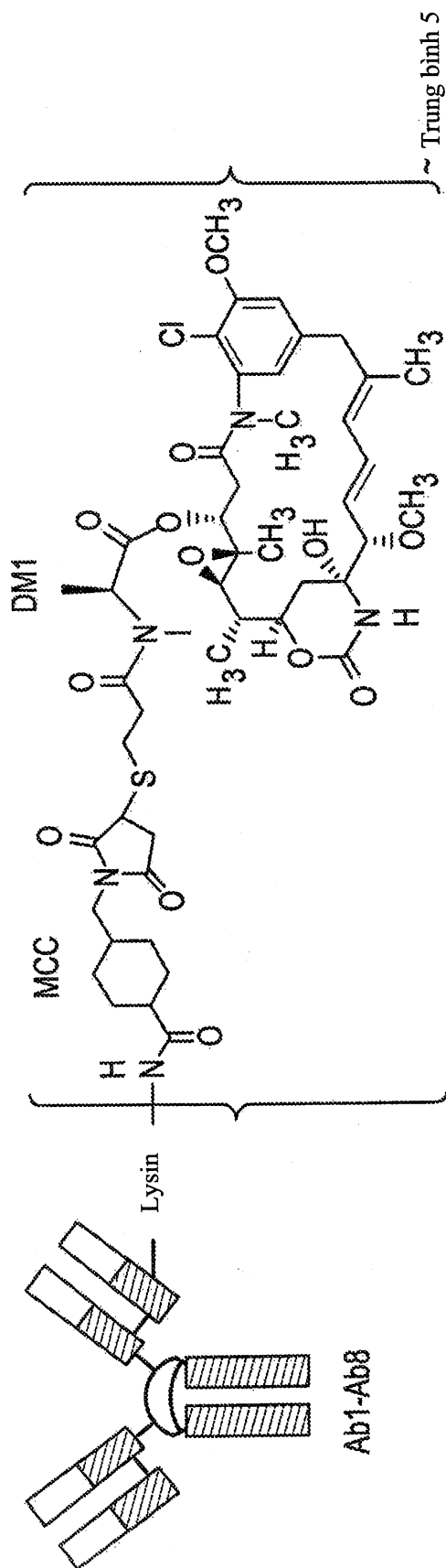
FIG. 10

Dạng khối u	Biểu hiện ARN		Biểu hiện Protein		
	Tài liệu	Amgen	IHC	Tài liệu	Đếm tế bào theo dòng
ung thư biểu mô thận loại tế bào sáng					
Nhiệt độ loại trừ tối ưu được gắn					
Mới làm đông lạnh	86% (n=6/7) 100% (n=10/10)	90% (n=44/49) 94% (n=44/47)		100% (n=41/41)	100% (n=13/13)
FFPE				82% (n=189/230)	n.d.
Các tập hợp con của B-NHL (đông lạnh)					
u lympho lan tỏa tế bào B lớn	85% (n=335/414)	100% (n=30/30) 100% (n=15/15)		71% (n=15/21)	67% (n=10/15)
u lympho tuyến nang	n.d.	64% (n=21/33) 100% (n=10/10)		33% (n=6/18)	50% (n=5/10)
u lympho tế bào vỏ	n.d.	100% (n=10/10)		25% (n=1/4)	n.d.
Bệnh bạch cầu lym-phô bào mẩn tính (đông lạnh)	n.d.	75% (n=21/28) 90% (n=9/10)		50% (n=3/6)	50% (n = 5/10)
				90% (17/19)	100% (11/11)

IHC = hóa mô miễn dịch
qPCR = PCR định lượng
n.d = không xác định

Các kết quả mARN của Amgen thể hiện: trong khoảng 35-50% ung thư tế bào vảy ở đầu và cổ (SCCH&N) (chủ yếu quan sát ở Nam Âu, primarily ESO); khoảng 14% các mẫu ung thư buồng trứng biểu hiện CD27L; 40% RCC như biểu hiện CD27L

FIG. 11



Cầu nối MCC: 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1 cacboxylat (nguyên liệu ban đầu SMCC)

FIG. 12

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DELANEY, John M.
 FANSLOW III, William Christian
 KING, Chadwick Terence

<120> PROTEIN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CD27L, CHẾ PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY
 VÀ PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ THỂ CỘNG HỢP THUỐC - KHÁNG THỂ CD27L

<130> A-1437-US-NP

<140> XX/XXX,XXX
 <141> 19-09-2012

<150> 61/538,024
 <151> 22-09-2011

<160> 94

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 193
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> CD27L người

<400> 1

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
 1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
 20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
 35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
 50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
 65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
 85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
 100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
 115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
 130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
 165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
 180 185 190

Pro

<210> 2
 <211> 217
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Tiền chất CD27 người

<400> 2

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His

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

```
<210> 3
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab1

```
<400>      3
cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctcacagac cctgtccctc
60
acctgcactg tctctgatgg ctccatcatc agtgggtgttt actactggag ctggatccgc
120
```

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gagcacctcc
180

tacaaccogt ccctcaagag tcgacttacc atgtcagtag acacgtctaa gaaccagttc
240

tccttgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgaggagt
300

ggatacagct atgccctctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca
360

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg
420

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg
480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca
540

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc
660

aaatcttggt acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga
720

ccgtcagttt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt
780

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg
840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag
960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
1020

aaagccaaag ggagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag
1080

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
1350

<210> 4
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab2

<400> 4
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc
60

acctgcactg tctctgggtga ctccatcatc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc
120

cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct ttacagtgg gagcaccgac
180

tacaaccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc
240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgaggagt
300

ggatacagct atgccctctt tgaccactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca
360

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg
420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg
480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca
540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc
660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga
720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct
780

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg
840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
900

agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag
960

gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag
1080

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg
1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
1350

<210> 5
<211> 1359
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỒN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab4

<400> 5
caggtgcagc tgggtggagtgc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tacactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat
180

gcgactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga
300

ggatatagtg gctacgattc ggggtttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc
 360
 ttctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag
 540
 ttctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaaagtt
 660
 gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
 720
 ggggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg
 780
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
 840
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
 900
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
 960
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
 1020
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
 1080
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct
 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc
 1260
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
 1320
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga
 1359

<210> 6
 <211> 1371

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab5

<400> 6
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc
 120
 actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat
 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac
 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtag
 300
 gatttttggg gtggttatta ctactactac tacggatatg acgtctgggg ccaagggacc
 360
 acggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag ggcccatccg tcttccccct ggcaccctcc
 420
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc
 480
 gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc
 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc
 600
 agcttgggca cccagacctc catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg
 660
 gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca
 720
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc
 780
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct
 840
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg
 900
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag
 960

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc
1020

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg
1080

cccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc
1140

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac
1200

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc
1260

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct
1320

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaata a
1371

<210> 7

<211> 1356

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab6

<400> 7

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct
60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt ggcacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatgggta cacacactat
180

gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac
240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac
300

ggtggtaacg actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggg caccgtctcc
360

tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct
420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg
480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc
540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag
600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag
660

cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg
720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggaac
780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac
840

tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac
900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc
960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc
1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag
1080

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac
1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc
1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg
1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac
1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga
1356

<210> 8
<211> 1350
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab7

<400> 8

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct
 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat
 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataac
 300
 agtcactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca
 360
 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg
 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg
 480
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca
 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc
 660
 aaatcttggt acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga
 720
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcattgatctc ccggaccct
 780
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg
 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
 900
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag
 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag
 1080
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
1260

cagcagggga acgtctttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
1350

<210> 9

<211> 1356

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng Ab8

<400> 9

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtga taaatacttt
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggg
300

atagcaggag ctcgctacgt ctactttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc
360

tcctcagcta gcaccaaggc cccatccgtc ttccccctgg caccctcttc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt
660

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1080

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgctgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 10
<211> 450
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Abl

<400> 10

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Gly	Ser	Ile	Ile	Ser	Gly
			20					25					30		

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

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

<210> 11
 <211> 450
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab2

<400> 11

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ile Ser Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp His Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 12
 <211> 452
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab4

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Gly 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	Ser	
			260					265					270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
		275					280					285				
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	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	Leu	Pro	Ala	Pro	
				325					330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
			340					345					350			
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	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> 13
<211> 456
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab5

<400> 13

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile 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 Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

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

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

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

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

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 14
 <211> 451
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab6

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 15
 <211> 450
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab7

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

435

440

445

Gly Lys
450

<210> 16
<211> 452
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng Ab8

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Glu 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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr 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 Ser
 260 265 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 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> 17
<211> 120
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Abl

<400> 17

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ser Gly
20 25 30

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 120
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab2

<400> 18

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ile Ser Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp His Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 120
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab3

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 122

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab4

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 126
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab3

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile 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 Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

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

<210> 22
<211> 121
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab6

<400> 22

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 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 Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
 <211> 120
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab7

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 122
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng Ab8

<400> 24

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

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

<210> 25
 <211> 7
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab1

<400> 25

Ser	Gly	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ser
1					5	

<210> 26
 <211> 7
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab2

<400> 26

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 27

<211> 5

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab3

<400> 27

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 28

<211> 5

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab4

<400> 28

Asn Tyr Gly Ile His
1 5

<210> 29

<211> 5

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> SYDIN

<400> 29

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 30

<211> 5

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab6

<400> 30

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 31

<211> 5

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab7

<400> 31

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nặng Ab8

<400> 32

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 33

<211> 16

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab1

<400> 33

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 16
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab2

<400> 34

Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab3

<400> 35

Val Ile Ser Asp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 36
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab4

<400> 36

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 37
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab5

<400> 37

Trp	Met	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 38
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab6

<400> 38

Trp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 39
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab7

<400> 39

Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 40
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nặng Ab8
 <400> 40

Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Phe	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 41
 <211> 10
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab1
 <400> 41

Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Leu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 42
 <211> 10
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab2
 <400> 42

Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Leu	Phe	Asp	His
1				5					10

<210> 43
 <211> 11
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab3

<400> 43

His Asp Tyr Ser Asn Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 44
 <211> 13
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab4

<400> 44

Asp Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 17
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> GYDFWSGYYYYYYGMDV

<400> 45

Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 46
 <211> 12
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab6

<400> 46

Asp	Tyr	Gly	Gly	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10		

<210> 47

<211> 11

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab7

<400> 47

Asp	Asn	Ser	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10	

<210> 48

<211> 13

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng Ab8

<400> 48

Asp	Gly	Ile	Ala	Gly	Ala	Arg	Tyr	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 49

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab1

<400> 49

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcgttgac agatatttca attggtatca gcagaaacct
120

gggaaagccc ctaaggctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcgggtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agctacagta ccccggtggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggaagtcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
642

<210> 50
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab2

<400> 50
gacatccaga tgacccagtc cccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcagttgcc gggcaagtca gttcattggc agatatttca attggtatca gcagcaacca
120

gggaaagccc ctaaggctcct gatctatgct gaatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

agattcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caagatacta ctgtcaacag agttacagta ccccggtggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
642

<210> 51
<211> 660
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab4

<400> 51
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc
60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg aatagtaatg gatacaacta tttggattgg
120

tacctgcaga agccaggga gtctccacag ttcctgatct atttgggttc ttatcgggac
180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgagaatc
240

agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgta tacaaactct acaaactcca
300

ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc
360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg
420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa
480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
540

agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa
600

gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag
660

<210> 52
<211> 651
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab5

<400> 52
gaaattgtgt tgacgcagtc tcctggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaga
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagtctggag
240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtctg cagtctggta gctctgtccc gctcactttc
300

ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc
360

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac
420

ttctatocca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac
480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc
540

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat
600

cagggcctga gctgcgccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a
651

<210> 53
<211> 651
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab6

<400> 53

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc
60tcttggttctg gaagcagctc caacatcgga attaattatg tatactggta ccagcagctc
120ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtgatc agcggccctc aggggtccct
180gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccctcag tggggtccgg
240tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tgggtgtggtg
300ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggccaaccga aagcggcgcc ctcggtcact
360ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggg gtgtctcata
420agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag
480gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc
540tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg
600catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttcata g
651

<210> 54

<211> 651

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab7

<400> 54

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc
60tcttgcaactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtaaattg gtatcagcag
120

ttcccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatgttaaca acaatcggcc ctccaggagtc
180

cctgaccgat tctctggctc cacgtctggc acctcagcct ccctggccat cactggactc
240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acaccagcct gagtgccttcg
300

gtattcggcg gagggaccag actgaccgtc ctaggccaac cgaaagcggc gccctcggtc
360

actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc
420

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc
480

aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc
540

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc
600

acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a
651

<210> 55
<211> 645
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ Ab8

<400> 55
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgtc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctgggtttca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaagggtg ggtcccatca
180

aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgccaacaa tattataatt acccattcac ttctggccct
300

gggaccacag tggatatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag
645

<210> 56
<211> 214
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Abl

<400> 56

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

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

Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

```

115              120              125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145              150              155              160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165              170              175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 57
<211> 214
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab2

<400> 57

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Arg Tyr
20              25              30

Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35              40              45

Tyr Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50              55              60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80

```

Glu Asp Phe Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 58
<211> 219
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab4

<400> 58

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 Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ile Gln Thr
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp 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> 59
 <211> 216
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỒN TẬP

<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab5

<400> 59

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Gly Ser Ser Val
85 90 95

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 60
 <211> 216
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab6

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Val 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> 61
 <211> 217
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab7

<400> 61

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

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

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

Leu Ile Tyr Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser
 85 90 95

Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

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

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

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 62
 <211> 214
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ Ab8

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys 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 Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 63

<211> 107

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab1

<400> 63

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

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

Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45
 Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly 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 Val Glu Val Lys
 100 105
 <210> 64
 <211> 107
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab2
 <400> 64
 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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Arg Tyr
 20 25 30
 Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 65
 <211> 108
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab3
 <400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro
 85 90 95

Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66
 <211> 112
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab4
 <400> 66

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 Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ile Gln Thr
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 67
<211> 109
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin miễn biến đổi chuỗi nhẹ Ab5
<400> 67

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Gly Ser Ser Val
85 90 95

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

<210> 68
<211> 110
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab6

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69
<211> 111
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab7

<400> 69

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

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

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

Leu Ile Tyr Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser
85 90 95

Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 70
<211> 107
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
<223> Trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ Ab8

<400> 70

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 Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys 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 Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 71
<211> 11
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab1

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Arg Tyr Phe Asn
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab2
<400> 72

Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Arg Tyr Phe Asn
1 5 10

<210> 73
<211> 12
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab3

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 74
 <211> 16
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab4

<400> 74

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
1				5					10					15	

<210> 75
 <211> 12
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab5

<400> 75

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 76
 <211> 13
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP
 <223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab6

<400> 76

Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ile	Asn	Tyr	Val	Tyr
1				5					10			

<210> 77
 <211> 14
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab7

<400> 77

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

<210> 78

<211> 11

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR1 chuỗi nhẹ Ab8

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 79

<211> 7

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab1

<400> 79

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 80

<211> 7

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab2

<400> 80

Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 81
 <211> 7
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab2
 <400> 81

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 82
 <211> 7
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab4
 <400> 82

Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser
 1 5

<210> 83
 <211> 7
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab5
 <400> 83

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 84
 <211> 7
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab6

<400> 84

Arg Ser Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 85

<211> 7

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab7

<400> 85

Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 86

<211> 7

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR2 chuỗi nhẹ Ab8

<400> 86

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly
1 5

<210> 87

<211> 9

<212> Protein

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP

<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab1

<400> 87

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 88

<211> 9

<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab2

<400> 88

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab3

<400> 89

Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro Cys Ser
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab4

<400> 90

Ile Gln Thr Leu Gln Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 91
<211> 10
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab5
<400> 91

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

<210> 92
 <211> 11
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab6

<400> 92

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
 1 5 10

<210> 93
 <211> 11
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab7

<400> 93

Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10

<210> 94
 <211> 9
 <212> Protein
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <223> Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nhẹ Ab8

<400> 94

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr
 1 5