



(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)



1-0026771

(51)<sup>7</sup> C07K 16/28; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2014-02489

(22) 10/07/2008

(62) 1-2010-00377

(86) PCT/EP2008/059026 10/07/2008

(87) WO2009/007427 15/01/2009

(30) 07301231.2 12/07/2007 EP; 60/929,789 12/07/2007 US; 61/020,639 11/01/2008 US

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/11/2010 272A

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)

45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-billancourt, France

(72) GOETSCH Liliane (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC, QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY  
VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình chọn lọc kháng thể kháng c-Met có khả năng ức chế quá trình hoạt hóa của c-Met phụ thuộc vào phối tử và không phụ thuộc vào phối tử. Cụ thể hơn, quy trình này dựa vào việc ức chế quá trình dime hoá c-Met.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các kháng thể và chế phẩm chứa các kháng thể này để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư. Đồng thời, quy trình và kit chẩn đoán cũng làm một phần của sáng chế.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể c-Met ở người và/hoặc có khả năng ức chế đặc hiệu hoạt tính tyrosin kinaza của thụ thể này, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ chuột, loại khảm và được làm tương thích với người, cũng như trình tự axit amin và axit nucleic mã hoá các kháng thể này. Đặc biệt, kháng thể theo sáng chế có khả năng ức chế quá trình dimer hoá c-Met. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các kháng thể này làm thuốc để phòng và/hoặc điều trị các bệnh ung thư hoặc bệnh lý bất kỳ liên quan đến sự biểu hiện quá mức của thụ thể này, cũng như trong các quy trình hoặc kit để chẩn đoán các bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức của c-Met. Sáng chế còn bao gồm các sản phẩm và/hoặc chế phẩm chứa các kháng thể như vậy kết hợp với các kháng thể và/hoặc hoá chất khác kháng các yếu tố sinh trưởng khác tham gia vào quá trình làm tiến triển hoặc di căn của khối u và/hoặc hợp chất và/hoặc tác nhân kháng ung thư hoặc tác nhân được tiếp hợp với độc tố và sử dụng chúng để phòng ngừa và/hoặc điều trị một số bệnh ung thư.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các tác nhân hướng đích thụ thể tyrosin kinaza (Receptor tyrosine kinase (RTK)), như các chất ức chế trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib và gefitinib, đã được chứng minh là có tác dụng hướng vào nhóm protein này để điều trị một số bệnh ung thư.

c-Met, là thành viên nguyên mẫu thuộc phân họ RTK, phân họ này cũng bao gồm RON và SEA. Họ RTK c-Met có cấu trúc khác với các họ RTK khác và là thụ thể có ái lực cao đã biết duy nhất đối với yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), còn được gọi là yếu tố phân tán (SF) [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]. c-Met và HGF được biểu hiện ở nhiều mô và chúng thường chỉ biểu hiện lần lượt các tế bào có nguồn gốc biểu mô và trung mô [M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]. Cả c-Met lẫn HGF đều cần thiết đối với sự phát triển bình thường ở động vật có vú và

được thấy là đặc biệt quan trọng trong quá trình di trú tế bào, phân hoá hình thái, và tổ chức cấu trúc hình ống ba chiều cũng như phát triển và tạo mạch [F. Baldt et al., *Nature* 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., *Nature*. 1995:373:699-702; Tsarfaty et al., *Science* 1994, 263:98-101]. Trong khi quá trình điều hòa có kiểm soát c-Met và HGF có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển, duy trì và sửa chữa mô ở động vật có vú [Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., *Brain Res.* 2004, 5;999(2):155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307(1):146-51], thì quá trình rối loạn điều hòa của chúng lại kéo theo sự tiến triển các bệnh ung thư.

Việc truyền tín hiệu sai do sự hoạt hóa không thích hợp của c-Met là một trong số các thay đổi thường xuyên nhất được quan sát thấy ở người bệnh ung thư và đóng một vai trò rất quan trọng trong việc tạo khối u và di căn [Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].

Sự hoạt hóa c-Met không thích hợp có thể phát sinh theo các cơ chế không phụ thuộc và phụ thuộc vào phối tử, chúng bao gồm sự biểu hiện quá mức của c-Met, và/hoặc sự hoạt hóa cận tiết hoặc tự tiết, hoặc thông qua sự gia tăng quá trình đột biến chức năng [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., *Cancer Letters.* 2005, 226:1-26]. Tuy nhiên, quá trình oligome hoá thụ thể c-Met, khi có hoặc không có phối tử, là cần thiết để điều hòa ái lực gắn kết và động học gắn kết của kinaza với cơ chất peptit chứa ATP và tyrosin [Hays JL, Watowich SJ, *Biochemistry*, 2004 Aug 17, 43:10570-8]. c-Met đã được hoạt hóa lôi kéo các chất tác động truyền tín hiệu đến vị trí đa nối của nó trong miền bào chất, dẫn đến sự hoạt hóa một số đường truyền tín hiệu chính, bao gồm Ras-MAPK, PI3K, Src và Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, *Cell Res.* 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene.* 2000, 19(49):5582-9]. Các đường này là rất cần thiết cho quá trình tăng sinh, xâm lấn và tạo mạch của tế bào khối u và tránh quá trình chết theo chương trình [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene*, 2000, 19(49):5582-9; Gu H, Neel BG, *Trends Cell Biol.* 2003 Mar, 13(3):122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, *Oncogene.* 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. Ngoài ra, so với RTK khác, nét độc đáo trong việc truyền tín hiệu của c-Met là sự tương tác của nó với các phức hợp bám dính tại tiêu điểm và các thành phần gắn kết không

phải kinaza như  $\alpha 6 \beta 4$  integrin [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, Cell. 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, J Biol Chem. 1999, 274(10):6499-506], Plexin B1 hoặc semaphorin [Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene. 2004, 23:5131-7], chúng có thể còn làm phức tạp thêm cho quá trình điều hòa chức năng tế bào của thụ thể này. Cuối cùng, dữ liệu gần đây đã chứng minh rằng c-Met có thể tham gia vào sự đề kháng của khối u đối với gefitinib hoặc erlotinib, điều này gợi ý rằng chế phẩm chứa hợp chất hướng vào cả EGFR lẫn c-Met có thể là rất đáng được quan tâm [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].

Trong vài năm qua, nhiều phương pháp khác nhau đã được phát triển để làm suy giảm việc truyền tín hiệu c-Met trong các dòng tế bào ung thư. Các phương pháp này bao gồm i) các kháng thể trung hoà kháng c-Met hoặc HGF/SF [Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] hoặc sử dụng chất đối kháng HGF/SF NK4 để ngăn ngừa sự gắn kết của phối tử với c-Met [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) các chất ức chế vị trí gắn kết ATP nhỏ với c-Met ức chế hoạt tính kinaza [Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) polypeptit miền SH2 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền can thiệp việc tiếp cận với vị trí đa nối và ARN can thiệp hoặc ribozym làm suy giảm mức độ biểu hiện của thụ thể hoặc phối tử. Hầu hết các phương pháp này đều mô tả cách ức chế chọn lọc c-Met, làm ức chế khối u và cho thấy rằng c-Met có thể được quan tâm để điều trị bệnh ung thư.

Trong số các phân tử được tạo ra để hướng đích c-Met, một số là các kháng thể.

Kháng thể được mô tả nhiều nhất là kháng thể kháng c-Met 5D5 do Genentech [WO96/38557] tạo ra, có tác dụng như một chất chủ vận tiềm năng khi



dùng một mình trong nhiều mô hình thử nghiệm khác nhau và như là một chất đối kháng khi được sử dụng làm đoạn Fab. Dạng được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có hoá trị một của kháng thể này đã được mô tả như là 5D5 một nhánh (OA5D5) và được tạo ra dưới dạng protein tái tổ hợp trong *E. Coli* cũng là đối tượng của đơn yêu cầu cấp patent [WO2006/015371] của Genentech. Tuy nhiên, phân tử này không thể được coi là kháng thể vì cấu trúc giàn giáo đặc biệt của nó, cũng thể hiện các đột biến có thể sinh miễn dịch ở người. Về mặt hoạt tính, phân tử không glycosyl hoá này không có chức năng tác động và không có dữ liệu rõ ràng nào chứng tỏ rằng OA5D5 ức chế quá trình dime hoá của c-Met. Ngoài ra, khi được thử nghiệm theo mô hình thử nghiệm G55 *in vivo*, dòng tế bào u nguyên bào xẹp lại biểu hiện c-Met mà không biểu hiện ARN thông tin và protein HGF và phát triển độc lập với phổi tử, kháng thể kháng c-Met một nhánh này không có tác dụng đáng kể đến sự phát triển khối u G55, điều này đã gợi ý rằng OA5D5 có tác dụng chủ yếu là ức chế sự gắn kết của HGF và không thể hướng đích là các khối u được hoạt hóa độc lập với HGF [Martens T. et al, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

Kháng thể khác hướng đích là c-Met đã được Pfizer mô tả là kháng thể có tác dụng “chủ yếu như là chất đối kháng c-Met, và theo một số trường hợp, như là chất chủ vận c-Met” [WO 2005/016382]. Không có dữ liệu nào cho thấy tác dụng bất kỳ của các kháng thể của Pfizer đến quá trình dime hoá c-Met được mô tả trong sáng chế.

Một trong các khía cạnh sáng tạo của sáng chế này là tạo ra các kháng thể đơn dòng của chuột nhất không có hoạt tính chủ vận nội tại và ức chế quá trình dime hoá c-Met. Ngoài việc hướng vào khối u phụ thuộc phổi tử, phương pháp này còn làm suy yếu quá trình hoạt hóa của c-Met không phụ thuộc vào phổi tử do sự biểu hiện quá mức của nó hoặc các đột biến của miền nội bào vẫn còn phụ thuộc vào quá trình oligome hoá để truyền tín hiệu. Mặt khác, các kháng thể như vậy có thể còn có tác dụng án ngữ không gian đối với sự tương tác của c-Met với các thành phần của nó, điều này sẽ làm suy yếu các chức năng của c-Met. Tốt hơn, nếu các kháng thể này sẽ được làm tương thích với người và được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, dưới dạng IgG1 người để có được chức năng tác động như ADCC và CDC, ngoài các chức năng liên quan đến việc ức chế đặc hiệu thụ thể c-Met.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Bất ngờ, lần đầu tiên các tác giả sáng chế đã tạo ra được kháng thể có khả năng gắn kết với c-Met, nhưng cũng có khả năng ức chế quá trình dimer hoá của c-Met. Đúng là trong tình trạng kỹ thuật, đôi khi người ta cũng cho rằng một kháng thể có khả năng ức chế quá trình dimer hoá của c-Met với các thành phần của nó có thể là kháng thể đáng quan tâm, nhưng kháng thể có khả năng như vậy chưa từng được bộc lộ, hoặc gợi ý một cách rõ ràng trong lĩnh vực này. Ngoài ra, về tính đặc hiệu của kháng thể, vẫn chưa có một bằng chứng nào cho thấy sự thành công trong việc tạo ra kháng thể hoạt tính như vậy.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Các đặc trưng và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ được thể hiện trong phân mô tả dưới đây qua các ví dụ và các hình vẽ, trong đó:

Fig.1 thể hiện ví dụ về profin FACS của các kháng thể kháng c-Met được chọn;

Fig.2A và Fig.2B thể hiện ức chế *in vitro* quá trình tăng sinh BXPC3 bằng các kháng thể hướng đích c-Met;

Fig.3 thể hiện ức chế quá trình dimer hoá c-Met;

Fig.4 thể hiện nhận biết protein bằng các kháng thể kháng c-Met;

Fig.5A và Fig.5B là “bản đồ epitop” của 11E1 và 5D5 bằng phân tích BIAcore;

Fig.6A và Fig.6B thể hiện tác dụng của MAbs đến quá trình phosphoryl hóa c-Met;

Fig.7A và Fig.7B thể hiện sự thay thế HGF được đánh dấu phóng xạ bằng các kháng thể kháng c-Met;

Fig.8 thể hiện sự ức chế sự xâm lấn bằng các kháng thể kháng c-Met [trên hình này, SVF được dùng để chỉ huyết thanh bào thai bê (FCS)];

Fig.9 thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng c-Met đến quá trình hồi phục vết thương;

Fig.10A và Fig.10B thể hiện thử nghiệm phân tán;

Fig.11 thể hiện sự thử nghiệm tạo ống ba chiều;

Fig.12A và Fig.12B thể hiện tác dụng của các kháng thể đến sự tạo thành khối phồng cầu;

Fig.13 thể hiện hoạt tính *in vivo* của Mab kháng c-Met trong mô hình dị ghép U87MG;

Fig.14 thể hiện sự biểu hiện HGF bằng một tập hợp các dòng tế bào khối u;

Fig.15A và Fig.15B thể hiện sự xác định đặc điểm dòng tế bào NCI-H441; với Fig.15A tương ứng với phân tích định lượng RT-PCR và Fig.15B tương ứng với phân tích FACS;

Fig.16 thể hiện hoạt tính *in vivo* của các kháng thể kháng c-Met đến mô hình dị ghép INCI-H441;

Fig.17A thể hiện sự sắp thẳng hàng 224G11 VL với gen dòng tế bào mầm IGKV3-5\*01 chuột;

Fig.17B thể hiện sự sắp thẳng hàng 224G11 VL với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*01 chuột ;

Fig.18A thể hiện sự sắp thẳng hàng 224G11 VL với gen dòng tế bào mầm IGKV3-11\*01 và IGKV4-1\*01 người;

Fig.18B thể hiện sự sắp thẳng hàng 224G11 VL với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 người;

Fig.19A: Phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV3-11\*01 của 224G11 VL với các đột biến nêu trên;

Fig.19B: Phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV4-1\*01 của 224G11 VL với các đột biến nêu trên;

Fig.20A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-18\*01 chuột;

Fig.20B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm IGHD2-4\*01 chuột;

Fig.20C thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm IGHJ2\*01 chuột;

Fig.21A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 người;

Fig.21B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*01 người;

Fig.22 thể hiện VH 224G11 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên;

Fig.23A thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGKV3-5\*01 chuột;

Fig.23B thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*01 chuột ;

Fig.24A thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGKV3-11\*01 và IGKV4-1\*01 người;

Fig.24B thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 người;

Fig.25A là phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV3-11\*01 của VL 227H1 với các đột biến nêu trên;

Fig.25B là phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV4-1\*01 của VL 227H1 với các đột biến nêu trên;

Fig.26A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-18\*01 chuột;

Fig.26B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGHD1-1\*02 chuột;

Fig.26C thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGHJ2\*01 chuột ;

Fig.27A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 người;

Fig.27B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*01 người;

Fig.28 thể hiện VH 227H1 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên;

Fig.29A thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGKV12-46\*01 chuột;

Fig.29B thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGKJ2\*01 chuột;

Fig.30A thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGKV1-NL1\*01 người;

Fig.30B thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGKJ2\*01 người;

Fig.31 thể hiện VL 223C4 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên;

Fig.32A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-18\*01 chuột;

Fig.32B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGHD6-3\*01 chuột ;

Fig.32C thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGHI4\*01 chuột ;

Fig.33A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 người;

Fig.33B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGHD1-26\*01 người;

Fig.33C thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm IGHI6\*01 người; và

Fig.34 thể hiện VH 223C4 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên;

Fig.35 thể hiện hoạt tính kháng khối u của Mab 224G11 của chuột một mình hoặc kết hợp với Navelbine<sup>®</sup> đến mô hình khối u NCI-H441 dị ghép được thiết lập;

Fig.36 thể hiện đánh giá Mab kháng c-Met đến quá trình tăng sinh HUVEC;

Fig.37 thể hiện đánh giá Mab kháng c-Met đến sự tạo ống HUVEC;

Fig.38A thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGKV4-79\*01 chuột ;

Fig.38B thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*01 chuột;

Fig.39A thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGKV3D-7\*01 người;

Fig.39B thể hiện sự sắp thẳng hàng VL 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 người;

Fig.40 là phiên bản được làm tương thích với người của VL 11E1 với các đột biến nêu trên;

Fig.41A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-7\*01 chuột;

Fig.41B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGHD4-1\*01 chuột ;

Fig.41C thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGHI3\*01 chuột;

Fig.42A thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 và IGHV1-46\*01 người;

Fig.42B thể hiện sự sắp thẳng hàng VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*03 người;

Fig.43 thể hiện VH 11E1 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên;

Fig.44A và Fig.44B thể hiện thử nghiệm phosphoryl hóa c-Met trên các tế bào A549. Đánh giá Mab được tinh chế 11E1 và 224G11, với sự không có mặt hoặc có mặt của HGF, ở nồng độ 30  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.44A) hoặc trong khoảng liều lượng từ 0,0015 đến 30  $\mu\text{g/ml}$  để xác định các giá trị  $\text{EC}_{50}$  (Fig.44B);

Fig.45 thể hiện sự kết hợp *in vivo* Mab 224G11 với Navelbine<sup>®</sup> trong NSCLC Mô hình dị ghép INCI-H441;

Fig.46 thể hiện sự kết hợp *in vivo* Mab 224G11 với doxorubixin trong mô hình dị ghép NSCLC NCI-H441;

Fig.47 thể hiện sự kết hợp *in vivo* Mab 224G11 với doxetaxel trong mô hình dị ghép NSCLC NCI-H441;

Fig.48 thể hiện sự kết hợp *in vivo* Mab 224G11 với Temozolomit trong mô hình dị ghép NSCLC NCI-H441;

Fig.49A, Fig.49B, Fig.49C và Fig.49D: Tác dụng của Mab kháng c-Met đến sự phát triển khối phồng cầu U87-MG;

Fig.50A và Fig.50B thể hiện hoạt tính *in vitro* của các dạng 224G11 khảm và được làm tương thích với người trong thử nghiệm phospho-c-Met;

Fig.51 thể hiện thiết lập phân tích Biacore;

Fig.52 thể hiện hoạt tính *in vitro* của 224G11 đến các tế bào MDA-MB-231 cùng được cấy bằng các tế bào MRC5 làm nguồn HGF người ở chuột nhắt trụi lông không có tuyến ức;

Fig.53 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-c-Met được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng chuột được sử dụng để phát hiện các kháng thể đơn dòng của chuột đã được tinh chế 11E1, 224G11 và 227H1. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo được đo ở bước sóng 450nm;

Fig.54 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh HGF-cMet. Trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA này, gốc Fc-cMET tái tổ hợp gắn kết với HGF được bao bằng chất

đeo với sự có mặt của các kháng thể đơn dòng của chuột đã được tinh chế 11E1, 224G11 và 227H1 được phát hiện bằng thể tiếp hợp Fc kháng chuột và được đo ở 450 nm;

Fig.55 thể hiện sự sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của miền VH tái tổ hợp thu được từ 227H1. Trình tự axit amin VH 227H1 được sắp thẳng hàng với trình tự khung nhận của người được chọn, chỉ với các axit amin đã nêu được thấy là khác với trình tự VH 227H1 của chuột. Các trình tự 227H1 HZ1, HZ2 và HZ3 VH tương ứng với phiên bản được làm tương thích với người đã được thực hiện của miền VH của chuột 227H1, với các gốc chuột còn lại ở dạng được in đậm. Trong HZ3, 10 gốc (\*) được thay đổi một cách tự động cho các phản tương ứng của chúng ở người. Trong HZ2, 7 gốc từ nhóm thứ ba (3) đã được nghiên cứu. Trong HZ1VH, 9 gốc từ nhóm thứ hai (2) được đột biến thành các phản tương ứng của chúng ở người, chỉ 6 gốc từ nhóm thứ nhất (1) vẫn là chuột;

Fig.56 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 227H1 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 227H1 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 227H1 thu được từ miền VH được làm tương thích với người được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.57 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể thu được từ 227H1 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 227H1 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của kháng thể 227H1 thu được từ HZ4VH được làm tương thích với người được đo ở bước sóng 450nm và sau đó được so sánh với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.58 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh HGF-cMet của các kháng thể chuột 227H1 và tái tổ hợp. Trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA này, gốc Fc-cMet tái tổ hợp gắn kết với HGF được bao bằng chất dẻo với sự có mặt của các dạng khác nhau của kháng thể 227H1 được phát hiện bằng kháng thể kháng cMet không liên quan đã được biotinyl hóa. Kháng thể đơn dòng 227H1 của chuột đã được tinh

chế, các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 227H1 được làm tương thích với người thu được từ HZ4VH và khả năng được thử nghiệm và được so sánh về khả năng của chúng trong việc cạnh tranh với gắn kết HGF-cMet khi được đo ở bước sóng 450nm;

Fig.59 thể hiện trình tự miền thay đổi được làm tương thích với người VH 227H1-HZ. \*, tương ứng với axit amin được thay đổi thực tế với các phản ứng của chúng ở người; !, tương ứng với axit amin được làm tương thích với người trong khi thực hiện từ HZ3 đến HZ1; Đ, tương ứng với các axit amin được làm tương thích với người trong trình tự VH 227H1-HZ cuối;

Fig.60 thể hiện sự sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của miền VH tái tổ hợp thu được từ 11E1. Trình tự axit amin VH 11E1 được sắp thẳng hàng với trình tự khung nhận của người được chọn, chỉ với các axit amin đã nêu được thấy là khác với trình tự chỉ với trình tự VH 11E1 chuột. Các trình tự 11E1 HZ VH1, VH2 và VH3 tương ứng với phiên bản được làm tương thích với người đã được thực hiện của miền VH của chuột 11E1, với các gốc chuột còn lại ở dạng được in đậm. Trong HZ VH3, 7 gốc (\*) được thay đổi một cách tự động cho các phản ứng của chúng ở người. Trong HZ VH2, 7 gốc từ nhóm thứ ba (3) đã được nghiên cứu. Trong HZ VH1, 5 gốc từ nhóm thứ hai (2) được đột biến thành các phản ứng của chúng ở người, chỉ 5 gốc từ nhóm thứ nhất (1) vẫn là chuột;

Fig.61 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 11E1 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 11E1 khả năng và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 11E1 thu được từ miền VH được làm tương thích với người được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khả năng gốc/tham chiếu ;

Fig.62 thể hiện sự sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của miền VL tái tổ hợp thu được từ 11E1. Trình tự axit amin VL 11E1 được sắp thẳng hàng với trình tự khung nhận của người được chọn, chỉ với các axit amin đã nêu được thấy là khác với trình tự VL 11E1 chuột. Các trình tự 11E1 HZ VL1, VL2 và VL3 tương ứng với các phiên bản được làm tương thích với người được thực hiện của miền VL chuột 11E1, với các gốc chuột còn lại được in đậm. Trong HZ VL3, mười gốc (\*) được thay đổi một cách tự động cho các phản ứng của chúng ở



người. Trong HZ VL2, 8 gốc từ nhóm thứ ba (3) đã được nghiên cứu. Trong HZ VL1, 8 gốc từ nhóm thứ hai (2) được đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người, chỉ 4 gốc từ nhóm thứ nhất (1) vẫn là chuột;

Fig.63 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 11E1 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 11E1 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 11E1 thu được từ miền VL được làm tương thích với người được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.64 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 11E1 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 11E1 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 11E1 thu được từ các miền được làm tương thích với người đơn hoặc kép được đo ở bước sóng 450nm và sau đó được so sánh với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.65 thể hiện sự sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của trình tự miền VH 224G11. Trình tự axit amin VH 224G11 được sắp thẳng hàng với trình tự VH 227H1 (được gạch dưới là các gốc không đồng nhất) và với trình tự khung nhận của người được chọn, chỉ với các axit amin đã nêu được thấy là khác với chuỗi trình tự VH 224G11. Trình tự 224G11 HZ VH0 tương ứng với phiên bản được làm tương thích với người “trên cơ sở 227H1/IMGT hoàn toàn” của miền VH của chuỗi 224G11. Trong trình tự này, không một gốc bên ngoài-IMGT-CDR vẫn là chuột;

Fig.66 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 224G11 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 224G11 được làm tương thích với người thu được từ HZVH0 và khảm. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của kháng thể 224G11 thu được từ miền VH được làm tương thích với người HZVH0 “IMGT hoàn toàn” được đo ở

bước sóng 450nm và sau đó được so sánh với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.67 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh HGF-cMet của 224G11 của chuột và các kháng thể tái tổ hợp. Trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA này, gốc Fc-cMet tái tổ hợp gắn kết với HGF được bao bằng chất dẻo với sự có mặt của các dạng khác nhau của kháng thể 224G11 được phát hiện bằng kháng thể kháng cMet không liên quan được biotinyl hóa. Kháng thể đơn dòng 224G11 của chuột được tinh chế, các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 224G11 được làm tương thích với người thu được từ HZVH0 và khảm được thử nghiệm và được so sánh về khả năng của chúng trong việc cạnh tranh với gắn kết HGF-cMet khi được đo ở bước sóng 450nm;

Fig.68 thể hiện sự sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của trình tự miền VL 224G11. Trình tự axit amin VL 224G11 được sắp thẳng hàng với hai trình tự khung nhận của người được chọn, chỉ với các axit amin đã nêu được thấy là khác với trình tự VL 224G11 của chuột. Trình tự 224G11 HZ VL3 tương ứng với phiên bản được làm tương thích với người “ngắn hơn-CDR1” của miền VH của chuột 224G11 trong khi HZ VL6 tương ứng với phiên bản “dài hơn-CDR1”, với các gốc chuột còn lại được in đậm. Đối với cả hai phiên bản được làm tương thích với người cơ sở, các gốc chuột còn lại được phân loại cho quy trình làm tương thích với người hơn nữa, trong đó \* tương ứng với các axit amin được làm tương thích với người trong các phiên bản cơ sở, và 3, 2 và 1 tương ứng với các nhóm của các gốc để thiết kế phiên bản được làm tương thích với người được thực hiện;

Fig.69 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 224G11 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 22G11 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 224G11 thu được từ miền VL3 và VL6 được làm tương thích với người được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.70 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 224G11 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 224G11 khảm và được làm tương

thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 224G11 thu được từ miễn VL được làm tương thích với người được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.71 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh HGF-cMet của các kháng thể tái tổ hợp và 224G11 của chuột. Trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA này, gốc Fc-cMet tái tổ hợp gắn kết với HGF được bao bằng chất dẻo với sự có mặt của các dạng khác nhau của kháng thể 224G11 được phát hiện bằng kháng thể kháng cMet không liên quan được biotinyl hóa. Kháng thể đơn dòng 224G11 của chuột đã được tinh chế, các kháng thể tái tổ hợp 224G11 thu được từ được làm tương thích với người thu được từ HZ VL4 và khảm được thử nghiệm và được so sánh về khả năng của chúng trong việc cạnh tranh với gắn kết HGF-cMet khi được đo ở bước sóng 450nm;

Fig.72 thể hiện trình tự axit amin của trình tự miễn VL 224G11 được làm tương thích với người VL4. \*, tương ứng với các axit amin được thay đổi thực tế với các phản ứng của chúng ở người trong phiên bản HZ VL6 cơ sở; !, tương ứng với các axit amin được làm tương thích với người trong quá trình thực hiện từ HZ VL6 đến HZ VL4; Đ, tương ứng với các axit amin vẫn là chuột trong trình tự 224G11-HZ VL4 ;

Fig.73 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 224G11 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 22G11 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các kháng thể 224G11 thu được từ các miễn được làm tương thích với người đơn hoặc kép được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.74 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh HGF-cMet của các kháng thể tái tổ hợp và 224G11 của chuột. Trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA này, gốc Fc-cMet tái tổ hợp gắn kết với HGF được bao bằng chất dẻo với sự có mặt của các dạng khác nhau của kháng thể 224G11 được phát hiện bằng kháng thể kháng cMet không liên quan được biotinyl hóa. Kháng thể đơn dòng 224G11 của chuột đã được tinh chế, các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn và khảm được thử nghiệm và được so sánh về khả

năng của chúng trong việc cạnh tranh với gắn kết HGF-cMet khi được đo ở bước sóng 450nm;

Fig.75 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 224G11 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 22G11 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các thể đơn đột biến của các kháng thể 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn thu được từ VL4 được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu;

Fig.76 thể hiện thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet của các kháng thể 224G11 tái tổ hợp. Hoạt tính gắn kết kháng Fc-cMet được đo trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA, trong đó thể tiếp hợp Fc kháng người được sử dụng để phát hiện các kháng thể tái tổ hợp thu được từ 22G11 khảm và được làm tương thích với người. Hoạt tính gắn kết phụ thuộc liều lượng đến Fc-cMet tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo của các thể đơn đột biến và đa của các kháng thể 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn thu được từ VL4 được đo ở bước sóng 450nm và sau đó so với hoạt tính gắn kết của kháng thể khảm gốc/tham chiếu; và

Fig.77 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh HGF-cMet của các kháng thể tái tổ hợp và 224G11 của chuột. Trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA này, gốc Fc-cMet tái tổ hợp gắn kết với HGF được bao bằng chất dẻo với sự có mặt của các dạng khác nhau của kháng thể 224G11 được phát hiện bằng kháng thể kháng cMet không liên quan đã được biotinyl hóa. Kháng thể đơn dòng 224G11 của chuột đã được tinh chế, các thể đột biến khảm và các thể đơn hoặc đa đột biến của các kháng thể tái tổ hợp 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn thu được từ VL4 được thử nghiệm và được so sánh về khả năng của chúng trong việc cạnh tranh với gắn kết HGF-cMet khi được đo ở bước sóng 450nm.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất và chọn lọc kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến quy trình chọn lọc kháng thể kháng c-Met,

hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, có khả năng ức chế quá trình hoạt hóa của c-Met phụ thuộc vào phối tử và không phụ thuộc vào phối tử, bao gồm các bước sau:

i) sàng lọc các kháng thể tạo ra và chọn lọc các kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với c-Met;

ii) đánh giá *in vitro* các kháng thể đã được chọn lọc thu được từ bước i) và chọn lọc các kháng thể có khả năng ức chế tăng sinh tế bào khối u với ít nhất là 50%, tốt hơn nếu ít nhất 60%, 70% hoặc 80% đối với ít nhất một loại khối u; và sau đó

iii) thử nghiệm các kháng thể đã được chọn lọc thu được từ bước ii) và chọn lọc các kháng thể có khả năng ức chế quá trình dime hoá c-Met.

Như đã được giải thích trên đây, việc ức chế quá trình dime hoá c-Met là khía cạnh chính của sáng chế vì các kháng thể như vậy sẽ được thực sự quan tâm đối với nhóm bệnh nhân lớn. Không những ung thư c-Met hoạt hóa phụ thuộc phối tử, mà còn ung thư c-Met hoạt hóa không phụ thuộc vào phối tử có thể được điều trị bằng các kháng thể được tạo ra bằng quy trình này.

Việc tạo ra kháng thể có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ như, dung hợp tế bào u tuỷ với các tế bào lá lách từ chuột nhất được gây miễn dịch hoặc các loài khác tương hợp với các tế bào u tuỷ được chọn [Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497]. Các con vật được gây miễn dịch có thể bao gồm chuột nhất chuyển gen với loci globulin miễn dịch người, sau đó trực tiếp tạo ra các kháng thể người. Phương án có thể khác có thể bao gồm việc sử dụng các công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn để sàng lọc các thư viện.

Bước sàng lọc i) có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ hoặc quy trình mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Để làm ví dụ minh hoạ, có thể kể đến phân tích ELISA, BIAcore, hoá mô miễn dịch, FACS và các sàng lọc chức năng. Quy trình được ưu tiên bao gồm việc sàng lọc bằng ELISA trên protein tái tổ hợp c-Met và sau đó bằng phân tích FACS trên ít nhất một dòng tế bào khối u để đảm bảo rằng các kháng thể tạo ra sẽ cũng có thể nhận biết được thụ thể tự nhiên trên các tế bào khối u. Quy trình này sẽ được mô tả một cách chính xác hơn trong các ví dụ sau.

Theo cùng cách, bước ii) cũng có thể được thực hiện theo phương pháp cổ điển bằng các phương pháp hoặc quy trình đã biết ví dụ như bằng cách sử dụng

3H-thymidin hoặc tác nhân nhuộm ADN khác bất kỳ, MTT, đánh giá ATP, v.v.. Kiểu tế bào khối u được ưu tiên có thể bao gồm kiểu BxPC3.

Thuật ngữ ức chế quá trình dimer hoá c-Met, tốt hơn nếu thuật ngữ này được hiểu là quá trình homodimer hoá c-Met.

Bước iii) là bước chọn lọc quy trình này, bao gồm việc đánh giá các kháng thể bằng phân tích BRET đối với các tế bào biểu hiện cả hai loại c-Met-RLuc/c-Met-YFP và chọn lọc các kháng thể có khả năng ức chế tín hiệu BRET với ít nhất là 30%, tốt hơn là 35%, 40%, 45%, 50%, 55% và tốt nhất là 60%.

Kỹ thuật BRET là kỹ thuật được đại diện bởi quá trình dimer hoá protein [Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89].

Kỹ thuật BRET được sử dụng ở bước iii) của quy trình, là đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ và sẽ được mô tả một cách chi tiết trong phần ví dụ thực hiện sáng chế sau. Cụ thể hơn, BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) là sự truyền năng lượng không bức xạ xảy ra giữa vật cho phát quang sinh học (Renilla Luciferase (Rluc)) và vật nhận phát huỳnh quang, thể đột biến của GFP (Green Fluorescent Protein) hoặc YFP (Yellow fluorescent protein). Trong trường hợp này, EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) được sử dụng. Hiệu quả của việc truyền năng lượng này tùy thuộc vào hướng và khoảng cách giữa vật cho và vật nhận. Sau đó, sự truyền năng lượng có thể xảy ra chỉ khi hai phân tử ở gần nhau (1-10 nm). Đặc tính chất này được sử dụng để tạo ra thử nghiệm tương tác protein-protein. Thực vậy, để nghiên cứu sự tương tác giữa hai thành phần, thành phần thứ nhất được dung hợp về mặt di truyền với Renilla Luxiferaza và thành phần thứ hai được dung hợp với thể đột biến màu vàng của GFP. Nói chung, nhưng không bắt buộc, các protein dung hợp được biểu hiện ở các tế bào động vật có vú. Với sự có mặt của cơ chất dễ thấm qua màng của nó (coelenterazin), Rluc phát ra ánh sáng màu xanh da trời. Nếu thể đột biến GFP cách Rluc một khoảng cách nhỏ hơn 10 nm, thì sự truyền năng lượng có thể xảy ra và tín hiệu màu vàng bổ sung có thể được phát hiện. Tín hiệu BRET được đo bằng tỷ lệ giữa ánh sáng được phát ra từ vật nhận và ánh sáng được phát ra từ vật cho. Vì vậy, tín hiệu BRET sẽ tăng khi hai protein dung hợp được đưa vào gần nhau hoặc nếu sự thay đổi hình thể khiến cho thể đột biến Rluc và GFP gần nhau hơn.

Nếu theo phương án ưu tiên, phân tích BRET bao gồm phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết có thể được

sử dụng để đo quá trình dime hoá c-Met. Không nhằm mục đích giới hạn, các công nghệ sau có thể được kể đến: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer-Truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang), HTRF (Homogenous Time resolved Fluorescence-Phát huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất), FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-Kính hiển vi hiện hình thời gian sống huỳnh quang) hoặc SW-FCCS (single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy-Quang phổ tương tác chéo phát huỳnh quang bước sóng đơn).

Các công nghệ cổ điển khác cũng có thể được sử dụng, như đồng kết tủa miễn dịch, sàng lọc Alpha, tạo liên kết ngang hoá học, lai kép, sắc ký ái lực, ELISA hoặc thăm tây Far.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập được, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, thu được bằng quy trình nêu trên. Kháng thể này hoặc một trong số các đoạn hoặc dẫn xuất của nó, là có khả năng gắn kết đặc hiệu với c-Met ở người và, nếu cần, tốt hơn là còn có khả năng ức chế sự gắn kết tự nhiên của phối tử HGF của nó và/hoặc có khả năng ức chế đặc hiệu hoạt tính tyrosin kinaza của c-Met này, kháng thể này cũng có khả năng ức chế quá trình dime hoá c-Met. Cụ thể hơn, các kháng thể này sẽ có khả năng ức chế quá trình hoạt hóa của c-Met phụ thuộc vào phối tử và không phụ thuộc vào phối tử.

Thuật ngữ “các đoạn chức năng và dẫn xuất” sẽ được xác định một cách chi tiết hơn trong phần mô tả sau.

Cần phải hiểu rằng, ở đây sáng chế không đề cập đến các kháng thể ở dạng tự nhiên, điều đó có nghĩa là chúng không ở trong môi trường tự nhiên của chúng, nhưng chúng có thể được phân lập hoặc thu được bằng cách tinh chế từ các nguồn tự nhiên, hoặc còn thu được bằng cách tái tổ hợp di truyền, hoặc bằng cách tổng hợp hoá học, và sau đó chúng có thể chứa các axit amin không có trong tự nhiên như sẽ được mô tả thêm dưới đây.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, kháng thể này khác biệt ở chỗ, kháng thể này bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ trợ CDR được chọn từ các CDR bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 1-17 và 56-61.

Kháng thể, hoặc đoạn hoặc dẫn xuất bất kỳ, có ít nhất một CDR có độ giống về trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95% và 98%, sau khi sắp thẳng hàng

tối ưu với các trình tự nêu trong SEQ ID No. 1-17 và 56-61 cần phải được hiểu là tương đương.

Thuật ngữ vùng CDR hoặc CDR(s) được dự định để chỉ các vùng siêu biên của các chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch như được xác định bằng IMGT.

Việc đánh số độc nhất IMGT được dùng để so sánh bất cứ miền thay đổi nào của thụ thể kháng nguyên, loại chuỗi, hoặc các gốc [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. và Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]. Theo cách đánh số độc nhất IMGT, các axit amin bảo toàn thường có cùng một vị trí, ví dụ cysteine 23 (1st-CYS), tryptophan 41 (Bảo TOÀN-TRP), axit amin kỵ nước 89, cysteine 104 (2nd-CYS), phenylalanine hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Việc đánh số độc nhất IMGT tạo ra sự phân định chuẩn hoá của các vùng khung (FR1-IMGT: các vị trí từ 1 đến 26, FR2-IMGT: từ 39 đến 55, FR3-IMGT: từ 66 đến 104 và FR4-IMGT: từ 118 đến 128) và của các vùng xác định bổ trợ: CDR1-IMGT: từ 27 đến 38, CDR2-IMGT: từ 56 đến 65 và CDR3-IMGT: từ 105 đến 117. Khi các khe hở tương ứng cho các vị trí trống, chiều dài CDR-IMGT (được thể hiện trong các dấu ngoặc vuông và được tách bằng các chấm nhỏ, ví dụ [8,8,13]) sẽ là thông tin quyết định. Việc đánh số độc nhất IMGT được sử dụng theo cách biểu diễn bằng đồ thị 2D, được ký hiệu là IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. và Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. và Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], và theo cấu trúc 3D được ký hiệu là IMGT/cấu trúc 3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Có 3 chuỗi nặng CDR và 3 chuỗi nhẹ CDR. Thuật ngữ CDR hoặc CDRs được sử dụng ở đây để chỉ, theo trường hợp này, một trong số các vùng này hoặc một số, hoặc thậm chí toàn bộ các vùng này chứa phần lớn gốc axit amin chịu trách nhiệm đối với việc gắn kết bằng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên hoặc epitop mà nó nhận biết.

Thuật ngữ “phần trăm độ giống” giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin trong bản mô tả này được dự định để chỉ phần trăm nucleotit hoặc gốc axit amin giống nhau giữa hai trình tự được so sánh, thu được sau khi sắp thẳng hàng tốt nhất (sắp thẳng hàng tối ưu), giá trị phần trăm này là giá trị đơn thuần về mặt



thống kê và sự khác biệt giữa hai trình tự được phân bố một cách ngẫu nhiên và trên toàn bộ chiều dài của chúng. Theo truyền thống, việc so sánh các trình tự giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được tiến hành bằng cách so sánh các trình tự này sau khi chúng đã được sắp hàng theo cách tối ưu, việc so sánh này có thể được tiến hành bằng bảng phân đoạn hoặc bằng “cửa sổ so sánh”. Ngoài phương pháp thủ công, việc sắp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh có thể được tiến hành bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith và Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Neddleman và Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48: 443], bằng phương pháp tra cứu tính tương tự của Pearon và Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], bằng phần mềm máy vi tính sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, or else by BLAST N or BLAST P comparison software).

Phần trăm độ giống giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin xác định bằng cách so sánh hai trình tự này được sắp hàng theo cách tối ưu và trong đó trình tự axit nucleic hoặc axit amin được so sánh có thể bao gồm việc bổ sung hoặc loại bỏ đối với trình tự tham chiếu để sắp thẳng hàng tối ưu giữa hai trình tự này. Phần trăm độ giống được tính toán bằng cách xác định số vị trí giống nhau mà nucleotit hoặc gốc axit amin là giống nhau giữa hai trình tự, bằng cách chia số vị trí giống nhau này cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh và bằng cách nhân kết quả thu được với 100 để thu được phần trăm độ giống giữa hai trình tự này.

Ví dụ, có thể sử dụng chương trình BLAST, “các trình tự BLAST 2” (Tatusova et al., “các trình tự Blast 2 – một công cụ mới để so sánh các trình tự protein và nucleotit”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) có thể có trên trang <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, các thông số được sử dụng là các thông số mặc định (cụ thể đối với các thông số “điểm phạt cho khe hở”: 5, và “điểm phạt cho khe kéo dài”: 2; ma trận được chọn, ví dụ, là ma trận “BLOSUM 62” được đề xuất bởi chương trình này), phần trăm độ giống giữa hai trình tự cần được so sánh được tính toán trực tiếp bằng chương trình này.

Thuật ngữ trình tự axit amin có độ giống về trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% so với trình tự axit amin tham chiếu, đối với trình tự tham chiếu chúng có một số cải biến nhất định, cụ thể là loại bỏ, bổ sung hoặc thay thế ít nhất một axit amin, cắt cụt hoặc kéo dài. Trong trường hợp thay thế

một hoặc nhiều axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp, các thay thế được ưu tiên là các thay thế trong đó các axit amin được thế bằng các axit amin “tương đương lượng”.

Thuật ngữ “các axit amin tương đương” được dùng để chỉ axit amin bất kỳ có khả năng được thế bằng một trong số các axit amin có cấu trúc cơ sở, tuy nhiên, chủ yếu là cải biến hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và như sẽ được xác định dưới đây, đặc biệt là trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Các axit amin tương đương này có thể được xác định bằng cách dựa vào độ tương đồng cấu trúc của chúng với các axit amin mà chúng thay thế, hoặc dựa vào kết quả của các thử nghiệm so sánh hoạt tính sinh học giữa các kháng thể khác nhau có thể được tiến hành.

Để ví dụ, có thể kể đến khả năng thay thế có thể được tiến hành mà không làm thay đổi nhiều về hoạt tính sinh học của kháng thể được cải biến tương ứng.

Để làm ví dụ minh họa, bảng dưới đây 1 đưa ra các khả năng thay thế có thể có được sự bảo toàn về hoạt tính sinh học của kháng thể cải biến. Tất nhiên, cũng có thể có thay thế ngược trong cùng một điều kiện.

Bảng 1

| Các gốc ban đầu | Các thay thế  |
|-----------------|---------------|
| Ala (A)         | Val, Gly, Pro |
| Arg (R)         | Lys, His      |
| Asn (N)         | Gln           |
| Asp (D)         | Glu           |
| Cys (C)         | Ser           |
| Gln (Q)         | Asn           |
| Glu (G)         | Asp           |
| Gly (G)         | Ala           |
| His (H)         | Arg           |
| Ile (I)         | Leu           |
| Leu (L)         | Ile, Val, Met |
| Lys (K)         | Arg           |
| Met (M)         | Leu           |
| Phe (F)         | Tyr           |
| Pro (P)         | Ala           |
| Ser (S)         | Thr, Cys      |
| Thr (T)         | Ser           |
| Trp (W)         | Tyr           |
| Tyr (Y)         | Phe, Trp      |
| Val (V)         | Leu, Ala      |

Theo phương án thứ nhất, kháng thể sẽ được xác định bởi trình tự chuỗi nặng của nó. Cụ thể hơn, kháng thể này hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDR được chọn từ các CDR bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 1-9 và 56-58.

Các trình tự này là các trình tự sau:

SEQ ID No. 1: GYIFTAYT

SEQ ID No. 2: IKPNNGLA

SEQ ID No. 3: ARSEITTEFDY

SEQ ID No. 4: GYSFTDYT

|                |                |
|----------------|----------------|
| SEQ ID No. 5:  | INPYNGGT       |
| SEQ ID No. 6:  | AREEITKDFDF    |
| SEQ ID No. 7:  | GYTFTDYN       |
| SEQ ID No. 8:  | INPNNGGT       |
| SEQ ID No. 9:  | ARGRYVGYYYAMDY |
| SEQ ID No. 56: | GYTFTSYW       |
| SEQ ID No. 57: | INPTTGST       |
| SEQ ID No. 58: | AIGGYGSWFAY    |

Các CDR của chuỗi nặng có thể được chọn một cách ngẫu nhiên trong trình tự trước, tức là SEQ ID No. 1-9 và 56-58.

Theo khía cạnh được ưu tiên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDR được chọn từ CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, trong đó:

- CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 1, 4, 7 hoặc 56,
- CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 2, 5, 8 hoặc 57, và
- CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 3, 6, 9 hoặc 58.

Theo phương án thứ nhất của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, trong đó CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 1, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 2 và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 3.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 18.

SEQ ID No. 18:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLG  
ESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSA  
VYYCARSEITTEFDYWGQGTLTIVSS

Theo phương án thứ hai của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, trong đó CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 5 và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 6.

Theo phương án thứ hai nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, sẽ bao gồm chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 19.

SEQ ID No. 19:

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTFDYTLNWVKQSH  
GKTLEWIGLINPYNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDS  
AVYYCAREEITKDFDFWGQGTTLTVSS

Theo phương án thứ ba của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, trong đó CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 7, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 8 và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 9.

Theo phương án thứ ba nêu trên, kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, sẽ bao gồm chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 20.

SEQ ID No. 20:

EVLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSH  
GMSLEWIGDINPNNGGTIFNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED  
AVYYCARGRYVGYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

Theo phương án thứ tư của khía cạnh nêu trên, kháng thể theo sáng chế, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, trong đó CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 56, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 57 và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 58.

Theo phương án thứ tư nêu trên, kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, sẽ bao gồm chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 62.

SEQ ID No. 62:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGGLWEI

GYINPTTGSTDYNQKLKDKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAI  
GGYGSWFAYWGQGLVTVSA

Theo phương án thứ hai, kháng thể sẽ được xác định bởi trình tự chuỗi nhẹ của nó. Cụ thể hơn, theo khía cạnh cụ thể thứ hai, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDR được chọn từ các CDR bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 10-17 và 59-61.

Các trình tự này là các trình tự sau:

SEQ ID No. 10: ESVDSYANSF

SEQ ID No. 11: RAS

SEQ ID No. 12: QQSKEDPLT

SEQ ID No. 13: ESIDTYGNSF

SEQ ID No. 14: QQSNEDPFT

SEQ ID No. 15: ENIYSN

SEQ ID No. 16: AAT

SEQ ID No. 17: QHFWGPPYT

SEQ ID No. 59: SSVSSTY

SEQ ID No. 60: TTS

SEQ ID No. 61: HQWSSYPFT

Các CDR của chuỗi nhẹ có thể được chọn một cách ngẫu nhiên trong trình tự trước, tức là SEQ ID No. 10-17 và 59-61.

Theo khía cạnh được ưu tiên khác, kháng thể này hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDR được chọn từ CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó:

- CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 10, 13, 15 hoặc 59,

- CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 11, 16 hoặc 60, và

- CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 12, 14, 17 hoặc 61.

Theo phương án thứ nhất của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nhẹ chứa CDR-

L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 10, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 11 và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 12.

Cụ thể hơn, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 21.

SEQ ID No. 21:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQ  
KPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQ  
SKEDPLTFGSGTKLEMK

Theo phương án thứ hai của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 13, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 11 và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 14.

Kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, sẽ bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 22.

SEQ ID No. 22:

GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESIDTYGNSFIHWYQQKP  
GQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDSATYYCQQSN  
EDPFTFGSGTKLEMK

Theo phương án thứ ba của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, bao gồm chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 15, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 16 và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 17.

Kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, sẽ bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 23.

SEQ ID No. 23:

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAHWYQQKQKSP  
QLLVYAATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSYYCQHFHWGP  
PYTFGGGKLEIK

Theo phương án thứ tư của khía cạnh nêu trên, kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, bao gồm chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 59, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 60 và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 61.

Kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, như nêu trên, sẽ bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 63.

SEQ ID No. 63:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSTLYWYQQKPGSSPKLWIYT  
TSILASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMETEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGT  
KLDIK

Theo phương án thứ ba, kháng thể sẽ được xác định bằng cả trình tự chuỗi nhẹ của nó lẫn trình tự chuỗi nặng của nó. Kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 18, 19, 20 hoặc 62 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 21, 22, 23 hoặc 63.

Cụ thể hơn, kháng thể được ưu tiên, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, có tên là 224G11, khác biệt ở chỗ, kháng thể này bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 1, 2 và 3; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 10, 11 và 12.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, có tên là kháng thể 224G11 bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 18 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 21.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, có tên là 227H1, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 4, 5 và 6; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 13, 11 và 14.



Sáng chế đề cập đến kháng thể 227H1 nêu trên bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 19 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 22.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, có tên là 223C4, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 7, 8 và 9; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 15, 16 và 17.

Sáng chế đề cập đến kháng thể 223C4 nêu trên bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 20 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 23.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, có tên là 11E1, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 56, 57 và 58; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 59, 60 và 61.

Sáng chế đề cập đến kháng thể 11E1 bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 62 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 63.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào lai của chuột có khả năng tiết các kháng thể đơn dòng theo sáng chế, đặc biệt là tế bào lai có nguồn gốc từ chuột như được nộp lưu tại Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, National Collection of Microorganism Cultures) (Institut Pasteur, Paris, France).

Sáng chế đề cập đến tế bào lai của chuột có khả năng tiết ra kháng thể đơn dòng theo sáng chế, được nộp lưu tại Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, National Collection of Microorganism Cultures) (Institut Pasteur, Paris, France) vào ngày 03/14/2007 với số nộp lưu I-3731.

Sáng chế mô tả tế bào lai của chuột được nộp lưu tại CNCM vào ngày 03/14/2007 với số nộp lưu CNCM I-3724 (tương ứng với 11E1), I-3732 (tương ứng với 227H1) và vào ngày 07/06/2007 với số nộp lưu I-3786 (tương ứng với 223C4). Các tế bào lai này bao gồm tế bào lai của chuột thu được từ quá trình dung hợp tế bào của tế bào lách chuột nhất được gây miễn dịch với dòng tế bào u tuỷ (Sp20 Ag14).

Bảng 2 dưới đây tập hợp các yếu tố liên quan đến các kháng thể được ưu tiên.

**Bảng 2**

|            | 224G11 |        | 227H1  |        | 223C4    |        | 11E1   |        |
|------------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|
|            | I-3731 |        | I-3732 |        | I-3786   |        | I-3724 |        |
|            | SEQ ID | SEQ ID | SEQ ID | SEQ ID | SEQ      | SEQ ID | SEQ ID | SEQ ID |
|            | Prot.  | Nucl.  | Prot;  | Nucl.  | ID Prot. | Nucl.  | Prot.  | Nucl.  |
| CDR-H1     | 1      | 24     | 4      | 27     | 7        | 30     | 56     | 64     |
| CDR-H2     | 2      | 25     | 5      | 28     | 8        | 31     | 57     | 65     |
| CDR-H3     | 3      | 26     | 6      | 29     | 9        | 32     | 58     | 66     |
| Chuỗi nặng | 18     | 41     | 19     | 42     | 20       | 43     | 62     | 70     |
| CDR-L1     | 10     | 33     | 13     | 36     | 15       | 38     | 59     | 67     |
| CDR-L2     | 11     | 34     | 11     | 34     | 16       | 39     | 60     | 68     |
| CDR-L3     | 12     | 35     | 14     | 37     | 17       | 40     | 61     | 69     |
| Chuỗi nhẹ  | 21     | 44     | 22     | 45     | 23       | 46     | 63     | 71     |

Từ bảng 2, dễ thấy rằng CDR-L2 của các kháng thể 227H1 và 224G11 là giống nhau. Ví dụ này thể hiện rõ ràng các kháng thể chứa ít nhất một CDR được chọn một cách ngẫu nhiên thông qua các trình tự CDR đã được mô tả.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc được sử dụng theo nghĩa thông thường của nó để chỉ kháng thể thu được từ nhóm các kháng thể gần như là đồng nhất, tức là các kháng thể riêng lẻ có trong nhóm là giống nhau, trừ các đột biến xuất hiện trong tự nhiên có thể mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Nói cách khác, kháng thể đơn dòng là kháng thể đồng nhất thu được từ quá trình tăng sinh của một dòng tế bào (ví dụ các tế bào lai, các tế bào chủ có nhân điển hình được chuyển nhiễm với ADN mã hóa kháng thể đồng nhất, các tế bào chủ không có nhân điển hình được biến nạp với ADN mã hóa kháng thể đồng nhất, v.v.), và nói chung khác biệt ở chuỗi nặng của một nhóm và phân nhóm, và chuỗi nhẹ của một

loại. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao chống lại một kháng nguyên. Hơn thế nữa, trái với chế phẩm chứa các kháng thể đa dòng thường bao gồm các kháng thể khác nhau chống lại yếu tố quyết định khác nhau, hoặc epitop, thì mỗi kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại một yếu tố quyết định trên kháng nguyên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ polypeptit, trình tự polypeptit, trình tự axit amin, peptit và các protein được gắn vào các hợp chất kháng thể hoặc vào trình tự của chúng có thể được dùng thay đổi cho nhau.

Theo khía cạnh cụ thể tương tự, sáng chế đề cập đến kháng thể khảm, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, theo sáng chế, khác biệt ở chỗ kháng thể này còn bao gồm các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của các loài khác loài chuột nhắt, đặc biệt là người, và các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể người lần lượt là vùng kappa và gama-1, gama-2 hoặc gama-4.

Trong đơn này, IgG1 được mô tả là có chức năng tác động, và ADCC và CDC.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thừa nhận rằng chức năng tác động bao gồm, ví dụ, gắn kết C1q; độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; độc tính tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể gây ra (ADCC); quá trình thực bào; và quá trình điều hòa giảm của thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B; BCR).

Tốt hơn, nếu các kháng thể này là các kháng thể đơn dòng đặc hiệu, đặc biệt là các kháng thể có nguồn gốc từ chuột, khảm hoặc được làm tương thích với người, có thể thu được theo các phương pháp chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Nói chung, để điều chế các kháng thể đơn dòng hoặc các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ chuột, có thể sử dụng kỹ thuật được mô tả một cách cụ thể trong ấn phẩm: the manual "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) hoặc kỹ thuật điều chế từ tế bào lai được mô tả trong ấn phẩm Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, từ tế bào động vật được gây miễn dịch kháng c-Met, hoặc một trong số các đoạn của nó

chứa epitop được nhận biết một cách đặc hiệu bằng các kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Tốt hơn, nếu c-Met này, hoặc một trong số các đoạn của nó, có thể được tạo ra theo các phương pháp thông thường, bằng cách tái tổ hợp di truyền đi từ trình tự axit nucleic có trong trình tự ADN bổ trợ mã hoá c-Met hoặc bằng cách tổng hợp peptit đi từ trình tự axit amin có trong trình tự peptit của c-Met.

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể, ví dụ, được tinh chế trên cột ái lực, trên đó c-Met hoặc một trong số các đoạn của nó chứa epitop được nhận biết một cách đặc hiệu bởi các kháng thể đơn dòng theo sáng chế đã được cố định trước đó. Cụ thể hơn, các kháng thể đơn dòng này có thể được tinh chế bằng sắc ký trên protein A và/hoặc G, sau đó có hoặc không có bước sắc ký trao đổi ion nhằm mục đích khử bỏ tạp chất protein còn lại cũng như ADN và LPS, bản thân nó sau đó cần hoặc không cần có bước sắc ký loại trừ trên gel Sepharose<sup>TM</sup> để khử bỏ các kết tụ tiềm năng do sự có mặt của các dime hoặc multime khác. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, tất cả các kỹ thuật này có thể được sử dụng một cách đồng thời hoặc lần lượt.

Các kháng thể khảm hoặc được làm tương thích với người cũng được bao gồm trong các kháng thể theo sáng chế.

Thuật ngữ kháng thể khảm được dự định để chỉ kháng thể chứa vùng (chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) thay đổi tự nhiên thu được từ kháng thể của các loài đã nêu kết hợp với các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể của các loài khác so với loài các loài đã nêu này (ví dụ chuột nhắt, ngựa, thỏ, chó, bò, gà, v.v.).

Các kháng thể hoặc các đoạn của chúng thuộc loại khảm theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, kháng thể khảm có thể được tạo ra bằng cách tạo dòng ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu và trình tự mã hoá vùng thay đổi của kháng thể đơn dòng không phải người, đặc biệt là chuột, theo sáng chế và trình tự mã hoá vùng ổn định của kháng thể người. Kháng thể khảm theo sáng chế được mã hoá bởi gen tái tổ hợp như vậy sẽ là, ví dụ, thể khảm chuột nhắt-người, tính đặc hiệu của kháng thể này được xác định bởi vùng thay đổi thu được từ ADN chuột và isotyp của nó được xác định bởi vùng ổn định thu được từ ADN người. Đối với các phương pháp điều chế các kháng thể khảm, có thể tham khảo các ấn phẩm Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) ou le brevet US 4,816,567 chẳng hạn.

Thuật ngữ kháng thể được làm tương thích với người được dự định để chỉ kháng thể chứa các vùng CDR thu được từ kháng thể có nguồn gốc không phải người, các phần khác của phân tử kháng thể thu được từ một (hoặc từ một số) kháng thể người. Ngoài ra, một số gốc của các đoạn khung (được gọi là FR) có thể được cải biến để bảo toàn ái lực gắn kết (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327, 1988).

Kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế hoặc các đoạn của chúng có thể được điều chế bằng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết (ví dụ như các kỹ thuật được mô tả trong ấn phẩm Singer et al., *J. Immun.* 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 1-142, 1992; hoặc Bebbington et al., *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992).

Phương pháp làm tương thích với người khác là đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết, ví dụ, phương pháp “ghép CDR” được Protein Design Lab (PDL) mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent số EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 hoặc US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 và US 5,693,761. Cũng có thể kể đến các đơn yêu cầu cấp patent sau : US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152 và US 5,877,293.

Thuật ngữ “đoạn chức năng” của kháng thể theo sáng chế được dự định để chỉ cụ thể đoạn kháng thể, như các đoạn Fv, scFv (sc đối với chuỗi đơn), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc hoặc các diabody, hoặc phân đoạn bất kỳ của nó, thời gian bán tồn sẽ được tăng lên bằng cách cải biến hoá học, như poly(alkylen) glycol bổ sung như poly(etylen) glycol (“PEG hoá”) (các đoạn được peg hóa được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG hoặc Fab'-PEG) (“PEG” đối với Poly(Etylen) Glycol), hoặc bằng cách kết hợp trong liposom, các đoạn này có ít nhất một CDR đặc thù có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1-17 và 56-61 theo sáng chế, và, đặc biệt là, ở chỗ nó có khả năng tác động theo cách chung, hoạt tính cục bộ ngang bằng của kháng thể từ đó nó được sinh ra, cụ thể như khả năng nhận biết và gắn kết với c-Met, và, nếu cần, ức chế hoạt tính của c-Met.

Sáng chế mô tả rằng các đoạn chức năng này sẽ được tạo thành hoặc sẽ bao gồm trình tự riêng phần của chuỗi thay đổi nặng hoặc nhẹ của kháng thể mà từ đó chúng được tạo ra, trình tự riêng phần này là đủ để giữ được cùng một tính đặc hiệu gắn kết như kháng thể đó nó được sinh ra và có ái lực đủ, ít nhất bằng 1/100,

hoặc ít nhất là 1/10 so với kháng thể từ đó nó được sinh ra, đối với c-Met. Đoạn chức năng như vậy sẽ chứa tối thiểu 5 axit amin, tốt hơn là 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 và 100 axit amin liên tiếp trên trình tự của kháng thể từ đó nó được sinh ra.

Các đoạn chức năng này sẽ là các đoạn Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), scFv-Fc type hoặc các diabody, nói chung chúng có cùng một tính đặc hiệu gắn kết như kháng thể từ đó chúng được sinh ra. Các đoạn này được chọn từ các đoạn có hoá trị hai như đoạn F(ab')<sub>2</sub>. Đoạn kháng thể theo sáng chế có thể thu được bắt đầu từ các kháng thể như được mô tả trên đây bằng các phương pháp như phân huỷ bằng enzym, như pepsin hoặc papain và/hoặc bằng cách phân giải các liên kết cầu disulfua bằng cách khử hoá học. Theo cách khác, các đoạn kháng thể được bao gồm trong sáng chế có thể thu được bằng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết hoặc bằng cách tổng hợp peptit, ví dụ, thiết bị tổng hợp peptit tự động như các thiết bị do công ty Applied Biosystems cung cấp, v.v..

Cần phải hiểu rằng thuật ngữ “đoạn có hoá trị hai” là đoạn kháng thể bất kỳ chứa hai nhánh và, cụ thể hơn, các đoạn F(ab')<sub>2</sub>.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc của chúng đoạn chức năng, theo sáng chế, đặc biệt là các kháng thể khảm hoặc được làm tương thích với người, thu được bằng cách tái tổ hợp di truyền hoặc bằng cách tổng hợp hoá học.

Thuật ngữ “dẫn xuất” của kháng thể theo sáng chế được dùng để chỉ protein gắn kết chứa cấu trúc giàn giáo protein và ít nhất một trong số các CDR được chọn từ kháng thể ban đầu để duy trì khả năng gắn kết. Các hợp chất như vậy là đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết và sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn gắn kết c-Met hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, dẫn xuất này chứa protein gắn kết có cấu trúc giàn giáo trên đó ít nhất một CDR được ghép để bảo toàn về đặc tính nhận biết paratopic của kháng thể ban đầu.

Một hoặc một số trình tự trong 6 trình tự CDR được mô tả trong sáng chế có thể được thể hiện trên cấu trúc giàn giáo protein. Trong trường hợp này, cấu trúc giàn giáo protein tái tạo mạch chính protein có cấu trúc cuộn gấp thích hợp của CDR được ghép, do đó cho phép nó (hoặc chúng) duy trì được đặc tính nhận biết paratopic kháng nguyên của chúng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết cách chọn

lọc cấu trúc giàn giáo protein trên đó ít nhất một CDR được chọn từ kháng thể ban đầu có thể được ghép. Cụ thể hơn, đã biết rằng để chọn được, cấu trúc giàn giáo như vậy phải biểu hiện một số dấu hiệu như sau (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

- sự bảo toàn tốt về mặt di truyền hình thể
- kiến trúc mạnh với tổ chức phân tử ba chiều đã biết ( ví dụ như tinh thể học hoặc NMR),
- kích thước nhỏ,
- các cải biến sau dịch mã là không có hoặc chỉ ở mức thấp,
- dễ tạo ra, biểu hiện và tinh chế.

Cấu trúc giàn giáo protein như vậy có thể là, nhưng không nhằm mục đích giới hạn, cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm fibronectin và tốt hơn là miền fibronectin thứ mười loại III (FNfn10), lipocalin, anticalin (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), dẫn xuất protein Z từ miền B của staphylococcal protein A, thioredoxin A hoặc protein bất kỳ có miền lặp lại như “miền lặp ankyrin” (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), “miền lặp armadillo”, “miền lặp giàu leuxin” hoặc “miền lặp tetratricopeptit”.

Cũng có thể kể đến cấu trúc giàn giáo thu được từ các độc tố (ví dụ như độc tố bọt cạp, côn trùng, thực vật hoặc động vật thân mềm) hoặc chất ức chế protein loại nơron nitric oxyt syntaza (PIN).

Để làm ví dụ minh họa các cấu trúc lai, có thể kể đến cài xen CDR-H1 (chuỗi nặng) của kháng thể kháng CD4, tức là kháng thể 13B8,2, vào một trong vòng PIN. Đặc tính gắn kết của protein gắn kết thu được vẫn tương tự với kháng thể ban đầu (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). Cũng có thể kể đến việc ghép CDR-H3 (chuỗi nặng) kháng thể VHH kháng lysozym trên vòng neocarzinostatin (Nicaise et al., 2004).

Trong trường hợp sáng chế, CDR thích hợp để bảo toàn có thể là, nhưng không giới hạn ở CDR-L2 khi nó được bảo toàn trong hai kháng thể nhận diện theo sáng chế, tức là 227H1 và 224G11.

Như nêu trên, cấu trúc giàn giáo protein như vậy có thể bao gồm từ 1 đến 6 CDR từ kháng thể ban đầu. Theo phương án ưu tiên, nhưng không kèm theo giới hạn bất kỳ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ lựa chọn ít nhất một CDR từ chuỗi nặng, chuỗi nặng này là được biết là có liên quan đặc biệt đến tính đặc hiệu của kháng thể. Việc chọn lọc CDR quan tâm sẽ là dễ dàng đối

với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này với phương pháp đã biết (BES et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Để chứng minh, các ví dụ này là không mang tính giới hạn và cấu trúc giàn giáo khác bất kỳ đã biết hoặc được mô tả phải được bao gồm trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập, khác biệt ở chỗ, nó được chọn từ các axit nucleic sau:

a) axit nucleic, ADN hoặc ARN, mã hoá kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, theo sáng chế;

b) axit nucleic bao gồm trình tự ADN chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau:

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26 và các trình tự nêu trong SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 34 và SEQ ID No. 35;

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 và các trình tự nêu trong SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 34 và SEQ ID No. 37;

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 và các trình tự nêu trong SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39 và SEQ ID No. 40; và

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 64, SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 66 và các trình tự nêu trong SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68 và SEQ ID No. 69;

c) axit nucleic bao gồm trình tự ADN chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau:

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 41 và SEQ ID No. 44;

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 42 và SEQ ID No. 45;

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 43 và SEQ ID No. 46, và

- trình tự nucleic bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 70 và SEQ ID No. 71;

d) các axit nucleic ARN tương ứng của các axit nucleic như được xác định ở mục b) hoặc c);



e) các axit nucleic bổ trợ của các axit nucleic như được xác định ở mục a), b) và c); và

f) axit nucleic có ít nhất 18 nucleotit có khả năng lai hoá trong các điều kiện rất nghiêm ngặt với ít nhất một trong số các CDR có trình tự nêu trong SEQ ID No. 24-40 và 64-69.

Thuật ngữ axit nucleic, trình tự nucleic hoặc axit nucleic, polynucleotit, oligonucleotit, trình tự polynucleotit, trình tự nucleotit, thuật ngữ này sẽ ít được sử dụng trong sáng chế, được dự định để chỉ liên kết chính xác của nucleotit, được cải biến hoặc không được cải biến, cho phép đoạn hoặc vùng axit nucleic được xác định, chứa hoặc không chứa nucleotit không có trong tự nhiên, và có thể tương ứng với ADN sợi kép, ADN sợi đơn như sản phẩm phiên mã của ADN này.

Cũng cần phải hiểu rằng sáng chế không đề cập đến các trình tự nucleotit trong môi trường nhiễm sắc thể tự nhiên của chúng, điều đó có nghĩa là ở trạng thái tự nhiên. Nó liên quan đến các trình tự được phân lập và/hoặc được tinh chế, điều đó có nghĩa là chúng được chọn một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ bằng cách sao chép môi trường của chúng được cải biến ít nhất một phần. Vì vậy, nó được dùng để chỉ axit nucleic phân lập thu được bằng cách tái tổ hợp di truyền bằng, ví dụ, các tế bào chủ hoặc thu được bằng cách tổng hợp hoá học.

Việc lai hoá trong các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao thể hiện rằng các điều kiện nhiệt độ và các điều kiện cường độ ion được chọn theo cách sao cho chúng cho phép duy trì việc lai hoá giữa hai đoạn ADN bổ sung. Để minh hoạ, các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao của bước lai hoá nhằm mục đích xác định đoạn polynucleotit được mô tả trên đây là như sau.

Việc lai hoá ADN-ADN hoặc ADN-ARN được tiến hành theo hai bước: (1) tiền lai hoá ở nhiệt độ 42°C trong thời gian 3 giờ trong dung dịch đệm phosphat (20 mM, độ pH=7,5) chứa 5 x SSC (1 x SSC tương ứng với dung dịch 0,15 M NaCl + 0,015 M natri xitrat), 50% formamit, 7% natri đodexyl sulfat (SDS), 10 x Denhardt's, 5% dextran sulfat và 1% ADN tinh trùng cá hồi; (2) việc lai hoá thực tế trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ phụ thuộc vào kích thước của đoạn dò (tức là: 42°C, đối với đoạn dò kích thước > 100 nucleotit) tiếp đó là 2 lần rửa 20 phút ở nhiệt độ 20°C trong 2 x SSC + 2% SDS, 1 lần rửa 20 phút ở nhiệt độ 20°C trong 0,1 x SSC + 0,1% SDS. Lần rửa cuối được tiến hành trong 0,1 x SSC + 0,1% SDS trong 30 phút ở nhiệt độ 60°C đối với đoạn dò có kích thước > 100 nucleotit. Các điều kiện lai hoá có tính nghiêm ngặt cao được mô tả trên đây

đối với polynucleotit có kích thước xác định có thể được điều chỉnh bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đối với oligonucleotit có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn, như được mô tả trong ấn phẩm: Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

Sáng chế cũng đề cập đến vật truyền chứa axit nucleic theo sáng chế.

Đặc biệt, sáng chế tập trung vào việc tạo dòng và/hoặc biểu hiện các vật truyền chứa trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế mô tả rằng vật truyền chứa các nguyên tố cho phép biểu hiện và/hoặc tiết các trình tự nucleotit trong tế bào chủ xác định. Do đó, vật truyền phải chứa gen khởi đầu, các tín hiệu khởi đầu và kết thúc quá trình dịch mã, cũng như các vùng thích hợp của việc điều hòa quá trình phiên mã. Nó phải có thể được duy trì theo cách ổn định trong tế bào chủ và có thể tùy ý có các tín hiệu cụ thể định rõ việc tiết protein đã được dịch mã. Các nguyên tố khác nhau này được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này chọn và tối ưu hoá theo chức năng của tế bào chủ được sử dụng. Để thực hiện điều này, các trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được cài xen vào vật truyền sao chép tự trị trong vật chủ được chọn, hoặc vật truyền hợp nhất của vật chủ được chọn.

Các vật truyền như vậy được điều chế bằng các phương pháp đang được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng, và các dòng vô tính thu được có thể được đưa vào vật chủ thích hợp bằng cách các phương pháp chuẩn, như lipofection, đục lỗ điện, sốc nhiệt, hoặc các phương pháp hoá học.

Ví dụ, các vật truyền theo sáng chế là vật truyền có nguồn gốc plasmid hoặc virus. Chúng là hữu ích để biến nạp các tế bào chủ để tạo dòng vô tính hoặc biểu hiện các trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các tế bào chủ được biến nạp bằng hoặc bao gồm vật truyền theo sáng chế.

Tế bào chủ có thể được chọn từ các hệ không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình, ví dụ các tế bào vi khuẩn, mà cũng là các tế bào nấm men hoặc các tế bào động vật, cụ thể các tế bào động vật có vú. Cũng có thể sử dụng các tế bào côn trùng hoặc các tế bào thực vật.

Sáng chế cũng đề cập đến các động vật, trừ người, bao gồm ít nhất một tế bào được biến nạp theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, đối tượng của sáng chế là quy trình tạo ra kháng thể, một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm các giai đoạn:

a) nuôi cấy bào chủ theo sáng chế trong môi trường và các điều kiện nuôi cấy thích hợp tế; và

b) thu hồi các kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của chúng, được tạo ra từ môi trường nuôi cấy hoặc các tế bào nuôi cấy nêu trên.

Các tế bào được biến nạp theo sáng chế có thể được sử dụng trong các quy trình để điều chế polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Các quy trình điều chế polypeptit theo sáng chế ở dạng tái tổ hợp, khác biệt ở chỗ chúng sử dụng vật truyền và/hoặc tế bào được biến nạp bằng vật truyền theo sáng chế, bản thân chúng được bao gồm trong sáng chế. Tốt hơn, nếu tế bào được biến nạp bằng vật truyền theo sáng chế được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit và peptit tái tổ hợp nêu trên được thu hồi.

Như đã nêu, tế bào chủ có thể được chọn từ hệ không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Cụ thể, có thể dễ xác định các trình tự nucleotit theo sáng chế, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiết vào hệ không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình như vậy. Do đó, có thể có lợi nếu vật truyền theo sáng chế mang trình tự như vậy được sử dụng để tạo ra các protein tái tổ hợp, được dùng để tiết. Thực tế, việc tinh chế các protein tái tổ hợp được quan tâm này sẽ được tạo điều kiện thuận lợi bởi thực tế là chúng có mặt trong dịch nổi bề mặt của dịch nuôi cấy tế bào chứ không phải là ở phía trong của các tế bào chủ.

Cũng có thể điều chế polypeptit theo sáng chế bằng cách tổng hợp hoá học. Quy trình điều chế như vậy cũng là đối tượng của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết được các quy trình tổng hợp hoá học, ví dụ kỹ thuật sử dụng pha rắn [Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)] hoặc kỹ thuật sử dụng pha rắn cục bộ, bằng cách ngưng tụ các phân đoạn hoặc bằng cách tổng hợp trong dung dịch tghéo phương pháp cổ điển. Polypeptit thu được bằng cách tổng hợp hoá học và có thể chứa các axit amin không có trong tự nhiên tương ứng cũng được bao gồm trong sáng chế.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của chúng, có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng làm thuốc.

Sáng chế mô tả được phẩm chứa hoạt chất là hợp chất bao gồm kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó theo sáng chế, tốt hơn là được trộn với tá dược và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.

Phương án bổ sung khác theo sáng chế bao gồm chế phẩm như được mô tả trên đây còn chứa sản phẩm phối hợp để dùng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt là kháng thể kháng khối u.

Kháng thể kháng khối u thứ hai có thể được chọn từ các kháng thể kháng IGF-IR, kháng EGFR, kháng HER2/neu, kháng VEGFR, kháng VEGF, v.v., hoặc các kháng thể kháng khối u khác bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Sáng chế mô tả việc sử dụng đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của các kháng thể nêu trên để làm kháng thể thứ hai.

Để làm kháng thể được ưu tiên nhất, các kháng thể kháng EGFR được chọn, ví dụ như kháng thể C225 (Erbix).

Thuật ngữ “sử dụng đồng thời” được dùng để chỉ việc dùng hai hợp chất của chế phẩm theo sáng chế ở dạng một dược phẩm và dược phẩm giống nhau.

Thuật ngữ “sử dụng riêng rẽ” được dùng để chỉ việc cho dùng đồng thời hai hợp chất của chế phẩm theo sáng chế dưới các dạng dược phẩm riêng biệt.

Thuật ngữ “sử dụng lần lượt” được dùng để chỉ việc dùng liên tiếp hai hợp chất của chế phẩm theo sáng chế, mỗi hợp chất dưới các dạng dược phẩm riêng biệt.

Theo cách chung, chế phẩm theo sáng chế làm tăng một cách đáng kể hiệu quả điều trị bệnh ung thư. Nói cách khác, tác dụng điều trị của kháng thể kháng c-Met theo sáng chế có hiệu lực theo cách bất ngờ bằng cách dùng tác nhân gây độc tế bào. Ưu điểm chính tiếp theo khác được tạo ra bởi chế phẩm theo sáng chế liên quan đến khả năng sử dụng liều hoạt chất thấp hơn có hiệu quả, cho phép tránh được hoặc giảm được các rủi ro về sự xuất hiện các tác dụng thứ cấp, cụ thể các tác dụng của tác nhân gây độc tế bào.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế sẽ cho phép đạt được tác dụng điều trị mong đợi nhanh hơn.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể khác biệt ở chỗ, nó còn bao gồm sản phẩm phối hợp để dùng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt, là tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào.

Thuật ngữ “tác nhân điều trị kháng ung thư” hoặc “tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào” được dùng để chỉ chất khi được cho đối tượng sử dụng, có

tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa sự phát triển ung thư trong cơ thể của đối tượng. Để làm ví dụ minh họa về các tác nhân như vậy, có thể kể đến các tác nhân alkyl hóa, các chất kháng chuyển hoá, chất kháng sinh kháng khối u, chất ức chế giảm phân, chất ức chế chức năng của chất nhuộm sắc, tác nhân chống tạo mạch, kháng estrogen, kháng androgen hoặc các chất điều biến miễn dịch.

Ví dụ, các tác nhân như vậy được trích dẫn trong ấn phẩm xuất bản năm 2001 của VIDAL, ở trang dành cho phần “the compounds attached to the cancerology and hematology” cột “Cytotoxics”, các hợp chất gây độc tế bào này được trích dẫn có viện dẫn đến tài liệu này được trích dẫn trong bản mô tả này là tác nhân gây độc tế bào được ưu tiên.

Các tác nhân sau được đề cập.

Thuật ngữ “tác nhân alkyl hóa” dùng để chỉ chất bất kỳ có thể liên kết ngang hoặc alkyl hoá phân tử bất kỳ, tốt hơn là axit nucleic (ví dụ ADN), trong tế bào. Ví dụ về tác nhân alkyl hóa bao gồm nitơ mustard như mecloetamin, clorambucol, melphalen, cloryđrat, pipobromen, prednimustin, disodic-phosphat hoặc estramustin; các oxazophorin như xyclophosphamit, altretamin, trofosfamid, sulfofosfamid hoặc ifosfamid; các aziridin hoặc imin-etylen như thiotepa, trietylenamin hoặc altetramin; nitrosoure như carmustin, streptozocin, fotemustin hoặc lomustin; alkyle-sulfonat như busulfan, treosulfan hoặc improsulfan; triazen như đacarbazin; hoặc phức chất platin như cis-platin, oxaliplatin và carboplatin.

Thuật ngữ “chất chống chuyển hoá” được dùng để chỉ các chất ức chế sự sinh trưởng và/hoặc sự trao đổi chất của tế bào bằng cách gây cản trở một số hoạt tính nhất định, thường là tổng hợp ADN. Ví dụ về các chất chống chuyển hoá bao gồm metotrexat, 5-fluoruraxil, floxuridin, 5-flodeoxyuridin, capecitabin, xytarabin, fludarabin, xytosin arabinosit, 6-mercaptapurin (6-MP), 6-thioguanin (6-TG), clodesoxyadenosin, 5-azaxytidin, gemxitabin, cladribin, deoxycoformyxin và pentostatin.

Thuật ngữ “chất kháng sinh kháng khối u” được dùng để chỉ các hợp chất có thể ngăn ngừa hoặc ức chế tổng hợp ADN, ARN và/hoặc protein. Ví dụ về chất kháng sinh kháng khối u bao gồm doxorubixin, daunorubixin, idarubixin, valrubicin, mitoxantron, dactinomycin, mithramycin, plicamycin, mitomycin C, bleomycin, và procarbazin.

Thuật ngữ “chất ức chế giảm phân” được dùng để chỉ các chất ngăn ngừa sự tiến triển bình thường của chu trình tế bào và phân bào. Nói chung, chất ức

chế vi quản hoặc taxoit như paclitaxel và docetaxel có khả năng ức chế quá trình phân bào. Vinca alkaloit như vinblastin, vincristin, vindesin và vinorelbin cũng có khả năng ức chế quá trình phân bào.

Thuật ngữ “chất ức chế chức năng của chất nhuộm sắc” hoặc “chất ức chế topoisomeraza” được dùng để chỉ các chất ức chế chức năng thông thường của chất nhuộm sắc tạo protein như topoisomeraza I hoặc topoisomeraza II. Ví dụ về chất ức chế chức năng của chất nhuộm sắc bao gồm, đối với topoisomeraza I, là camptothecin và các dẫn xuất của nó như topotecan hoặc irinotecan, và, đối với topoisomeraza II, là etoposid, etoposid phosphat và teniposid.

Thuật ngữ “tác nhân chống tạo mạch” dùng để chỉ thuốc, hợp chất, chất hoặc tác nhân bất kỳ ức chế sự phát triển của các mạch máu. Tác nhân chống tạo mạch được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, BMS-275291, thalidomide, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamin, endostatin, SU5416, SU6668, interferon-alpha, EMD121974, interleukin-12, IM862, angiostatin và vitaxin.

Thuật ngữ “kháng estrogen” hoặc “tác nhân kháng estrogen” được dùng để chỉ chất bất kỳ có tác dụng làm giảm, đối kháng hoặc ức chế tác dụng của estrogen. Ví dụ về các tác nhân kháng estrogen là tamoxifen, toremifen, raloxifen, droloxifen, idoxifen, anastrozol, letrozol, và exemestan.

Thuật ngữ “kháng androgen” hoặc “tác nhân kháng androgen” được dùng để chỉ chất bất kỳ có tác dụng làm giảm, đối kháng hoặc ức chế tác dụng của androgen. Ví dụ về kháng androgen là flutamid, nilutamit, bicalutamit, sprironolacton, xyproteron axetat, finasterit và ximitidin.

Thuật ngữ “các chất điều biến miễn dịch” là các chất kích thích hệ miễn dịch.

Ví dụ về các chất điều biến miễn dịch bao gồm interferon, interleukin như aldesleukine, OCT-43, denileukin diflitox và interleukin-2, yếu tố gây hoại tử khối u như tasonermine hoặc các chất điều biến miễn dịch khác như lentinan, sizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademase, thymopentine, poly I:C hoặc levamisole kết hợp với 5-flouraxil.

Để chi tiết hơn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tham khảo sách hướng dẫn của “Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique” and entitled “traité de chimie thérapeutique, vol. 6,

Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003”.

Để làm tác nhân hoá học hoặc tác nhân gây độc tế bào, cũng có thể kể đến tất cả các chất ức chế kinaza ví dụ như gefitinib hoặc erlotinib.

Sáng chế mô tả rằng, để làm sản phẩm phối hợp theo sáng chế, chế phẩm này, khác biệt ở chỗ, tác nhân gây độc tế bào được liên hợp hoá học với kháng thể nêu trên để dùng đồng thời.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc liên hợp giữa tác nhân gây độc tế bào và kháng thể theo sáng chế, đặc biệt là có thể đưa vào các phân tử đệm giữa hai hợp chất cần được liên hợp, như poly(alkylen) glycol như polyetylen glycol, hoặc axit amin, hoặc theo phương án khác, sử dụng các dẫn xuất có hoạt tính của tác nhân gây độc tế bào đã được đưa vào các chức năng có khả năng phản ứng với kháng thể theo sáng chế. Các kỹ thuật liên hợp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và sẽ không được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp khác biệt ở chỗ ít nhất một trong số các kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của chúng, được tiếp hợp với độc tố tế bào và/hoặc nguyên tố phóng xạ.

Độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ nêu trên có khả năng ức chế ít nhất một hoạt tính tế bào của các tế bào biểu hiện c-Met, theo cách được ưu tiên hơn có khả năng ngăn ngừa sự phát triển hoặc tăng sinh của tế bào này, đặc biệt là làm mất hoạt tính hoàn toàn của tế bào này.

Sáng chế mô tả rằng độc tố nêu trên còn là độc tố vi khuẩn đường ruột, đặc biệt là *Pseudomonas exotoxin A*.

Tốt hơn, nếu các nguyên tố phóng xạ (hoặc đồng vị phóng xạ) được tiếp hợp với các kháng thể được sử dụng để điều trị là các đồng vị phóng xạ phát ra tia gama và tốt hơn là  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , vàng<sup>199</sup>, paladi<sup>100</sup>, đồng<sup>67</sup>, bismut<sup>217</sup> và antimon<sup>211</sup>. Các đồng vị phóng xạ phát ra các tia beta và alpha có thể cũng được sử dụng để điều trị.

Thuật ngữ độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ được tiếp hợp với ít nhất một kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, theo sáng chế, được dự định để chỉ phương pháp bất kỳ cho phép độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ này gắn kết với ít nhất một kháng thể nêu trên, đặc biệt là bằng cách liên hợp cộng hóa trị giữa hai hợp chất, có hoặc không bổ sung phân tử liên kết.

Trong số các tác nhân cho phép liên kết theo cách hoá học (cộng hóa trị), tính điện hoặc không cộng hóa trị của tất cả hoặc một phần trong số các hợp phần của thể tiếp hợp, cụ thể có thể kể đến benzoquinon, carbođiimit và cụ thể hơn EDC (1-etyl-3-[3-đimetyl-aminopropyl]-carbođiimit hydroclorua), đimaleimit, axit dithiobis-nitro benzoic (DTNB), N-succinimidyl S-axetyl thio-axetat (SATA), các tác nhân liên kết cầu có một hoặc nhiều nhóm phenylazit phản ứng với tia cực tím (U.V.) và tốt hơn là N-[4-(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamit (APDP), N-succinimid-yl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), 6-hyđrazino-nicotinamit (HYNIC).

Dạng liên hợp khác, đặc biệt là đối với các nguyên tố phóng xạ, có thể bao gồm việc sử dụng chất chelat dạng ion có hai nhóm chức.

Trong số các chất chelat này, có thể kể đến các chelat thu được từ EDTA (axit etylenđiamintetraaxetic) hoặc từ DTPA (axit dietylentriaminpentaaxetic) được phát triển để liên kết kim loại, đặc biệt là kim loại phóng xạ, và globulin miễn dịch. Do vậy, DTPA và các dẫn xuất của nó có thể được thể bằng cách các nhóm khác nhau trên mạch cacbon để làm tăng độ ổn định và độ bền của phức chất phối tử-kim loại (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); US patent 4,831,175).

Ví dụ, axit dietylentriaminpentaaxetic (DTPA) và các dẫn xuất của nó, được sử dụng một cách rộng rãi trong y học và trong sinh học trong thời gian dài dưới dạng tự do của chúng, hoặc dưới dạng phức hợp với ion kim loại, có đặc tính đáng chú ý làm tạo ra các chelat ổn định với ion kim loại và được liên hợp với các protein mong muốn dùng để điều trị hoặc chẩn đoán như các kháng thể để phát triển thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ trong điều trị bệnh ung thư (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

Sáng chế mô tả rằng ít nhất một kháng thể nêu trên tạo ra thể tiếp hợp theo sáng chế được chọn từ các đoạn chức năng của nó, đặc biệt là các đoạn bị cắt ra khỏi hợp phần Fc của chúng như các đoạn scFv.

Sáng chế mô tả rằng tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào nêu trên hoặc độc tố tế bào và/hoặc nguyên tố phóng xạ được liên hợp hoá học với ít nhất một trong số các nguyên tố của chế phẩm này để dùng đồng thời.

Sáng chế bao gồm chế phẩm nêu trên để dùng làm thuốc.

Ngoài ra, sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế để bào chế thuốc.



Trong bản mô tả này, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, và/hoặc chế phẩm như được mô tả trên đây để bào chế thuốc dùng để ức chế quá trình phát triển và/hoặc quá trình tăng sinh của các tế bào khối u.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó và/hoặc chế phẩm như được mô tả trên đây hoặc sử dụng nêu trên để bào chế thuốc dùng để phòng hoặc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế quá trình phát triển và/hoặc quá trình tăng sinh của các tế bào khối u ở người bệnh bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng hoặc điều trị bệnh ung thư ở người bệnh cần điều trị, bao gồm bước cho người bệnh dùng kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Theo khía cạnh được đặc biệt ưu tiên, ung thư là ung thư được chọn từ ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm xương, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư màng trong tử cung, u nguyên bào xốp hoặc ung thư ruột kết.

Như được giải thích trên đây, sáng chế có ưu điểm là cho phép điều trị bệnh ung thư liên quan đến sự hoạt hoá Met phụ thuộc và không phụ thuộc vào HGF.

Theo khía cạnh khác, sáng chế bao gồm phương pháp chẩn đoán *in vitro* các bệnh do sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường thụ thể c-Met bằng cách sử dụng mẫu sinh học bị nghi ngờ có sự có mặt không bình thường của thụ thể c-Met, phương pháp này khác biệt ở chỗ, nó bao gồm bước, trong đó mẫu sinh học được tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, kháng thể này có thể được đánh dấu, nếu cần.

Sáng chế cũng mô tả rằng các bệnh liên quan đến sự có mặt không bình thường của thụ thể c-Met trong phương pháp chẩn đoán này sẽ là bệnh ung thư.

Kháng thể nêu trên, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, có thể có mặt dưới dạng thể tiếp hợp miễn dịch hoặc kháng thể được đánh dấu để thu được tín hiệu có thể phát hiện và/hoặc có thể xác định.

Các kháng thể được đánh dấu theo sáng chế hoặc đoạn chức năng của chúng bao gồm, ví dụ, các kháng thể được gọi là thể tiếp hợp miễn dịch có thể được tiếp hợp, ví dụ, với enzym như peroxidaza, kiềm phosphataza, beta-D-galactosidaza, glucoza oxydaza, glucoza amylaza, cacbonic anhydrasa, axetylcholinsteraza, lysozym, malat dehydroaza hoặc glucoza 6-phosphat dehydroaza hoặc với phân tử như biotin, đigoxin hoặc 5-bromdeoxyuridin. Nhãn huỳnh quang có thể cũng được tiếp hợp với các kháng thể hoặc đoạn chức năng của chúng theo sáng chế và đặc biệt là bao gồm fluorescein và các dẫn xuất của nó, flocrom, rhodamin và các dẫn xuất của nó, GFP (GFP là Protein phát huỳnh quang xanh lá cây “Green Fluorescent Protein”), dansyl, umbelliferon v.v.. Trong các thể tiếp hợp như vậy, các kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn chức năng của chúng có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng có thể được liên hợp với enzym hoặc nhãn huỳnh quang một cách trực tiếp hoặc qua trung gian là nhóm đệm hoặc nhóm liên kết như polyaldehyt, như glutaraldehyt, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit dietylen-triaminpentaaxetic (DTPA), hoặc với sự có mặt của chất liên hợp như các chất đã được đề cập trên đây đối với thể tiếp hợp điều trị. Thể tiếp hợp chứa nhãn phát huỳnh quang có thể được điều chế bằng phản ứng với isothioxyanat.

Các thể tiếp hợp khác có thể cũng bao gồm các nhãn phát quang hoá học như luminol và dioctetan, nhãn phát quang sinh học như luxiferaza và luxiferin, hoặc nhãn phóng xạ như  $\text{iot}^{123}$ ,  $\text{iot}^{125}$ ,  $\text{iot}^{126}$ ,  $\text{iot}^{133}$ ,  $\text{brom}^{77}$ ,  $\text{tecneti}^{99m}$ ,  $\text{indi}^{111}$ ,  $\text{indi}^{113m}$ ,  $\text{gali}^{67}$ ,  $\text{gali}^{68}$ ,  $\text{ruteni}^{95}$ ,  $\text{ruteni}^{97}$ ,  $\text{ruteni}^{103}$ ,  $\text{ruteni}^{105}$ ,  $\text{thủy ngân}^{107}$ ,  $\text{thủy ngân}^{203}$ ,  $\text{reni}^{99m}$ ,  $\text{reni}^{101}$ ,  $\text{reni}^{105}$ ,  $\text{scandi}^{47}$ ,  $\text{telu}^{121m}$ ,  $\text{telu}^{122m}$ ,  $\text{telu}^{125m}$ ,  $\text{thulium}^{165}$ ,  $\text{thulium}^{167}$ ,  $\text{thulium}^{168}$ ,  $\text{flo}^{18}$ ,  $\text{ytri}^{199}$ ,  $\text{iot}^{131}$ . Phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiện có để liên hợp đồng vị phóng xạ điều trị với các kháng thể một cách trực tiếp hoặc thông qua tác nhân cang hóa như EDTA, DTPA đã được đề cập trên đây có thể được sử dụng đối với các nguyên tố phóng xạ có thể được sử dụng trong chẩn đoán. Cũng có thể kể đến việc đánh dấu bằng  $\text{Na}[\text{I}^{125}]$  theo phương pháp cloramin T [Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] hoặc bằng  $\text{tecneti}^{99m}$  theo phương pháp của Crockford các đồng tác giả (US patent 4,424,200) hoặc được gắn vào qua DTPA như được Hnatowich (US patent 4,479,930) mô tả.

Do vậy, các kháng thể, hoặc đoạn chức năng của chúng, theo sáng chế có thể được sử dụng trong quy trình phát hiện và/hoặc xác định sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường, tốt hơn là biểu hiện quá mức của thụ thể c-Met trong mẫu sinh học, khác biệt ở chỗ quy trình này bao gồm các bước sau:

- a) cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, theo sáng chế; và
- b) để cho phức hợp c-Met/kháng thể có thể được tạo thành.

Theo phương án cụ thể, các kháng thể, hoặc đoạn chức năng của chúng, theo sáng chế, có thể được sử dụng trong quy trình phát hiện và/hoặc xác định thụ thể c-Met trong mẫu sinh học, để theo dõi hiệu quả của việc điều trị phòng và/hoặc chữa bệnh ung thư phụ thuộc c-Met.

Một cách tổng quát hơn, có lợi nếu các kháng thể, hoặc đoạn chức năng của chúng theo sáng chế có thể được sử dụng trong tình huống bất kỳ, trong đó sự biểu hiện của thụ thể c-Met phải được quan sát thấy theo cách định tính và/hoặc định lượng.

Mẫu sinh học được tạo ra bởi chất lỏng sinh học, như huyết thanh, máu tổng, các tế bào, mô mẫu hoặc mẫu sinh thiết có nguồn gốc từ người.

Phương pháp bất kỳ hoặc thử nghiệm thông thường có thể được sử dụng để tiến hành việc phát hiện và/hoặc liều lượng như vậy. Thử nghiệm này có thể là thử nghiệm cạnh tranh hoặc thử nghiệm sandwich, hoặc thử nghiệm bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này phụ thuộc vào sự tạo thành phức hợp miễn dịch của loại kháng thể-kháng nguyên. Sau khi ứng dụng theo sáng chế, kháng thể hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó có thể được cố định hoặc được đánh dấu. Việc cố định này có thể được tiến hành trên nhiều chất mang đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đặc biệt là, các chất mang này có thể bao gồm kính, polystyren, polypropylen, polyetylen, dextran, nylon, hoặc các tế bào tự nhiên hoặc được cải biến. Các chất mang này có thể là tan hoặc không tan.

Để làm ví dụ, phương pháp được ưu tiên trong các quy trình enzym miễn dịch theo kỹ thuật ELISA, là kỹ thuật huỳnh quang miễn dịch, hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc kỹ thuật tương đương.

Sáng chế mô tả kit hoặc bộ dụng cụ cần thiết để tiến hành phương pháp chẩn đoán các bệnh do sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường của thụ thể c-Met hoặc để tiến hành quy trình phát hiện và/hoặc xác định

sự biểu hiện quá mức hoặc sự biểu hiện dưới mức bình thường của thụ thể c-Met trong mẫu sinh học, như sự biểu hiện quá mức của thụ thể này, khác biệt ở chỗ kit hoặc bộ dụng cụ này bao gồm các thành phần sau:

- a) kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, theo sáng chế;
- b) tùy ý, chất phản ứng để tạo ra môi trường thuận lợi cho phản ứng miễn dịch;
- c) tùy ý, chất phản ứng cho phép biểu hiện phức hợp c-Met/kháng thể được tạo ra bởi phản ứng miễn dịch.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể hoặc chế phẩm theo sáng chế để bào chế thuốc được dự định để hướng đích đặc hiệu hoạt chất sinh học đến các tế bào biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức thụ thể c-Met.

Thuật ngữ hoạt chất sinh học được dự định dùng để chỉ hợp chất bất kỳ có khả năng điều biến, đặc biệt là ức chế, hoạt tính tế bào, cụ thể quá trình phát triển của chúng, quá trình tăng sinh của chúng, quá trình phiên mã hoặc dịch mã gen.

Sáng chế cũng mô tả chất phản ứng chẩn đoán *in vivo* bao gồm kháng thể theo sáng chế, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, tốt hơn là được đánh dấu, đặc biệt là được đánh dấu phóng xạ, và sử dụng nó trong chuẩn đoán hình ảnh, cụ thể để phát hiện ung thư liên quan đến sự biểu hiện hoặc sự biểu hiện quá mức bởi tế bào của thụ thể c-Met.

Sáng chế cũng mô tả chế phẩm dưới dạng sản phẩm phối hợp hoặc đến thể tiếp hợp kháng c-Met/độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ, theo sáng chế, được dùng làm thuốc.

Chế phẩm nêu trên dưới dạng sản phẩm phối hợp hoặc thể tiếp hợp sẽ được trộn với tá dược và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.

Trong bản mô tả này, chất dẫn thuốc được dụng được dự định để chỉ hợp chất hoặc hỗn hợp chứa các hợp chất khi đưa vào được phẩm không gây ra các phản ứng thứ cấp và cho phép, ví dụ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc dùng hoạt chất, sự tăng thời gian tồn tại của nó và/hoặc hiệu quả của nó trong cơ thể, sự tăng độ tan của nó trong dung dịch hoặc cải thiện mức độ bảo toàn của nó. Các chất dẫn thuốc được dụng này là đã biết và sẽ được điều chỉnh bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo bản chất và kiểu dùng hoạt chất được chọn.

Các hợp chất này sẽ được cung cấp theo đường toàn thân, cụ thể theo đường tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng hoặc dưới da, hoặc dùng qua đường miệng. Theo cách được ưu tiên hơn, chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế sẽ được cho dùng vài lần, theo cách tuần tự.

Kiểu dùng, liều lượng và dạng dược phẩm tối ưu của chúng có thể được xác định theo các tiêu chuẩn nói chung có tính đến trong khi tiến hành điều trị được làm thích ứng với người bệnh, ví dụ như độ tuổi hoặc thể trọng của người bệnh, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý chung của người bệnh, sự dung nạp trong điều trị và các tác dụng thứ cấp cần chú ý.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1: Tạo kháng thể kháng c-Met**

Để tạo ra các kháng thể kháng c-Met, chuột nhắt BALB/c 8 tuần tuổi được gây miễn dịch được tiêm dưới da từ 3 đến 5 lần dòng tế bào được chuyển nhiễm CHO biểu hiện c-Met trên màng sinh chất của nó ( $20 \times 10^6$  tế bào/liều/con) hoặc từ 2 đến 3 lần protein dung hợp miễn ngoại bào c-Met (10-15  $\mu\text{g}$ /liều/con) (R&D Systems, Catalog # 358MT) hoặc các phân đoạn của protein tái tổ hợp này được trộn với thuốc phù trợ Freund đầy đủ để gây miễn dịch lần thứ nhất và thuốc phù trợ Freund không đầy đủ cho các con chuột sau. Các quy trình phối hợp trong đó chuột nhắt được nhận cả các tế bào CHO-cMet và các protein tái tổ hợp cũng được tiến hành. Ba ngày trước khi dung hợp tế bào, chuột nhắt được tiêm trong màng bụng hoặc i.v. protein tái tổ hợp hoặc các phân đoạn của chúng. Sau đó, các lá lách của chuột được thu gom và được dung hợp với các tế bào u tủy SP2/0-Ag14 (ATCC) và được tiến hành chọn lọc HAT. 4 lần dung hợp được tiến hành. Nói chung, để điều chế các kháng thể đơn dòng hoặc đoạn chức năng của chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ chuột, có thể sử dụng kỹ thuật được mô tả cụ thể trong ấn phẩm “Antibodies” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) hoặc kỹ thuật điều chế tế bào lai được Kohler và Milstein mô tả (Nature, 256:495-497, 1975).

Các tế bào lai thu được ban đầu được sàng lọc bằng ELISA trên protein tái tổ hợp c-Met và sau đó bằng Phân tích FACS trên các dòng tế bào tủy A549 NSCLC, BxPC3, và u nguyên bào xóp U87-MG (các protein đại diện được thể hiện trên Fig.1) để đảm bảo rằng các kháng thể được tạo ra sẽ cũng có khả năng nhận biết thụ thể tự nhiên trên các tế bào khối u. Các thiết bị phản ứng dương trên

2 thử nghiệm này được khuếch đại, được tạo dòng vô tính và tập hợp các tế bào lai được thu hồi, được tinh chế và được sàng lọc về khả năng của nó trong việc ức chế *in vitro* quá trình tăng sinh của tế bào trong mô hình BxPC3.

Nhằm mục đích đó, 50 000 tế bào BxPC3 được cho vào trong các đĩa có 96 lỗ trong môi trường RPMI, 2 mM L. Glutamin, không có SVF. 24 giờ sau khi cho vào đĩa, các kháng thể cần được thử nghiệm được bổ sung ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,0097 đến 40  $\mu\text{g/ml}$  60 phút trước bổ sung 100 ng/ml hHGF. Sau 3 ngày, các tế bào được tạo xung với 0,5  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]thymidin trong thời gian 16 giờ. [ $^3\text{H}$ ]thymidin được đưa vào ADN không tan trong axit tricloaxetic được định lượng bằng cách đếm nhấp nháy chất lỏng. Các kết quả được thể hiện dưới dạng dữ liệu chưa xử lý để đánh giá một cách thực sự tác dụng chủ vận nội tại của mỗi Mab (Fig.2A và Fig.2B).

Sau đó, các kháng thể ức chế quá trình tăng sinh của tế bào ít nhất là 50% được đánh giá dưới dạng dịch nổi bề mặt bằng phân tích BRET trên các tế bào được chuyển nhiễm c-Met. Nhằm mục đích đó, các dòng tế bào ổn định CHO biểu hiện C-Met-Rluc hoặc C-Met-Rluc và C-Met-K1100A-YFP được tạo ra. Các tế bào được phân bố trong các vi đĩa có 96 lỗ trắng trong môi trường nuôi cấy DMEM-F12/FBS 5% một hoặc hai ngày trước khi tiến hành các thử nghiệm BRET. Các tế bào trước tiên được nuôi cấy ở 37°C với 5% CO<sub>2</sub> để cho phép sự gắn kết tế bào vào đĩa. Sau đó, các tế bào được bổ đối với 200  $\mu\text{l}$  DMEM/lỗ qua đêm. Ngay trước khi thử nghiệm, DMEM được loại bỏ và các tế bào được rửa qua bằng PBS. Các tế bào được ủ trong PBS với sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể cần được thử nghiệm hoặc các hợp chất tham chiếu, 10 phút ở 37°C trước khi bổ sung coelenterazin có hoặc không có HGF với thể tích cuối bằng 50  $\mu\text{l}$ . Sau khi ủ thêm 10 phút ở nhiệt độ 37°C, sự thu nhận phát sáng ở 485 nm và 530 nm được bắt đầu bằng cách sử dụng phát quang kế Mithras (Berthold) (1s/bước sóng/lỗ được lặp lại 15 lần).

Tỷ lệ BRET được xác định trước đó [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689] là: [(mức độ phát sáng ở 530 nm)-(mức độ phát sáng ở 485 nm) X Cf]/(mức độ phát sáng ở 485 nm), trong đó Cf tương ứng với (mức độ phát sáng ở 530 nm) / (mức độ phát sáng ở 485 nm) đối với các tế bào biểu hiện protein dung hợp Rluc một mình trong cùng một điều kiện thử nghiệm. Rút gọn phương trình này thấy rằng tỷ lệ BRET tương ứng với tỷ lệ 530/485 nm thu được khi hai thành phần có mặt, được hiệu chỉnh bằng tỷ lệ 530/485 nm thu được

trong cùng một điều kiện thử nghiệm, chỉ khi thành phần này được dung hợp với *R. reniformis luxiferaza* có mặt trong thử nghiệm. Để có thể đọc được, các kết quả được biểu hiện bằng đơn vị miliBRET (mBU); mBU tương ứng với tỷ lệ BRET được nhân với 1000.

Sau thử nghiệm *in vitro* thứ hai này, 4 kháng thể i) không có hoạt tính nội tại như là phân tử nguyên vẹn trong thử nghiệm chức năng tăng sinh, ii) ức chế một cách đáng kể quá trình tăng sinh BxPC3 (Fig.2A và Fig.2B) và iii) ức chế quá trình dime hoá c-Met (Fig.3) được chọn. 3 kháng thể này có isotyp IgG1 *kappa* được mô tả là 11E1, 224G11, 223C4 và 227H1. Trong các thử nghiệm này, 5D5 Mab, do Genentech tạo ra, và có ở ATCC, được bổ sung làm kháng thể đối chứng đối với hoạt tính chủ vận nội tại.

Fig.2A và Fig.2B cho thấy rằng 11E1, 224G11, 223C4 và 227H1 không có hoạt tính chủ vận bất kỳ trái với 5D5 gây ra sự kích thích phụ thuộc liều lượng đối với quá trình tăng sinh của tế bào với sự không có mặt của phối tử. Sự ức chế đáng kể quá trình tăng sinh của tế bào được quan sát với 4 kháng thể được chọn. 5D5 là không có tác dụng đến quá trình tăng sinh của tế bào do HGF gây ra trong thử nghiệm này.

Khi đánh giá sự ức chế quá trình dime hoá, các tác dụng đáng kể đạt được là ức chế quá trình dime hoá 32, 55, 69 và 52% lần lượt đối với 224G11, 223C4, 11E1 và 227H1 được quan sát. So sánh với các tín hiệu cơ sở trong các thử nghiệm tương ứng, kháng thể 5D5 là không có tác dụng trong mô hình dime hoá này.

#### Ví dụ 2: Nhận biết protein của các kháng thể kháng c-Met

Để xác định cách nhận biết 3 kháng thể được chọn, 3 ELISA được thiết lập với protein c-Met tái tổ hợp, phân đoạn monome của nó (thu được bằng cách phân giải protein c-Met-Fc tái tổ hợp và miền SEMA tái tổ hợp).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.4 đã thể hiện rằng 4 kháng thể đã nhận biết cả các protein dime và monome. Để thực hiện ELISA này, protein c-Met dime người (R&D systems, cat# 358MT) được phủ ở nồng độ bằng 0,7 µg/ml trong PBS qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi làm bão hoà các đĩa (Costar #3690) bằng dung dịch 0,5% gelatin trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 37°C, dịch nổi bề mặt tế bào lai được ủ 1 giờ ở 37°C. Sau khi được rửa bằng PBS, kháng thể HRP kháng chuột nhất (Jackson ImmunoResearch, catalog #115-035-164) được bổ

sung vào mỗi lỗ ở mức pha loãng 1/5000 trong dung dịch đệm ELISA (0,1% gelatin/0,05% Tween 20 trong PBS) và các đĩa được ủ trong 1 giờ ở 37°C. sau 3 lần rửa trong PBS, hoạt tính của peroxylđaza được biểu lộ bằng cách thêm 50  $\mu$ l cơ chất TMB (Uptima). Phản ứng được xảy ra trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dừng phản ứng này bằng cách thêm 50  $\mu$ l/lỗ dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M và đọc trên thiết bị đọc đĩa ở 450 nm. Loại quy trình này được thực hiện trên c-Met monome và miền SEMA nhưng trong các trường hợp đó, các protein lần lượt được phủ ở 5 và 3  $\mu$ g/ml.

Mab 5D5 được dùng làm đối chứng dương có khả năng nhận biết như protein SEMA mong đợi. 224G11, 227H1 và 223C4 không gắn kết miền SEMA. 11E1 có khả năng gắn kết với SEMA.

Để xác định xem 11E1 và 5D5, cả hai đều nhận biết miền SEMA cạnh tranh để chồng lấn các epitop, phân tích BIAcore được tiến hành. Hệ BIAcore dựa trên dữ liệu hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách theo dõi các sự kiện gắn kết trong thời gian thực. Sau đó, có thể nhóm các kháng thể trong các thử nghiệm được gọi là “lập bản đồ epitop”. Cặp kháng thể không thể gắn kết một cách đồng thời vào phân tử kháng nguyên được phân loại trong cùng một nhóm (cùng một vị trí liên kết hoặc các vị trí liên kết cạnh nhau). Ở phía đối diện, khi các vị trí liên kết tương ứng của chúng là đủ xa để cho phép gắn kết đồng thời cả hai kháng thể, sau đó chúng được phân loại thành hai nhóm khác nhau. Trong các thử nghiệm như vậy, kháng nguyên thường được sử dụng dưới dạng phối tử (được cố định trên chip cảm biến) và các kháng thể này được sử dụng mà không cần nhãn bất kỳ làm chất phân tích (pha dung dịch).

Toàn bộ thử nghiệm mô tả được tiến hành trên thiết bị BIAcore X (GE Healthcare Europe GmbH). Chip cảm biến CM5 (BIAcore) được hoạt hóa bởi Mab kháng Tag-6His chuột nhắt (R&D Systems ref. MAB050) được điều chế theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất bằng cách sử dụng kit liên hợp amin (BIAcore). Dung dịch đệm chạy (HBS-EP) và dung dịch đệm tái sinh (Glyxin, HCl) là từ BIAcore. Phiên bản tan tái tổ hợp của thụ thể HGF người được tạo ra dưới dạng phân tử khảm c-Met-Fc-Tag His là từ R&D systems (ref. 358-MT-CF). Các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25°C, ở tốc độ chảy bằng 30  $\mu$ l/phút. Dung dịch 10  $\mu$ g/ml chứa c-Met trong dung dịch đệm chạy được phun trong thời gian 1 phút trên flowcell2 (fc2) thường là c-Met ở dạng tan loại 270 RU bị hút vào. flowcell1 (fc1) được sử dụng làm tham chiếu để kiểm tra sự gắn kết không đặc hiệu bất kỳ



của các kháng thể vào nền chip cảm biến.

Việc tiêm liên tiếp các kháng thể cần được thử nghiệm được tiến thành. Kháng thể được phun lên cả hai flowcell trong thời gian 2 phút. Kháng thể thứ hai (hoặc vẫn kháng thể này) sau đó được phun trong cùng một các điều kiện. Nếu không quan sát được sự gắn kết đáng kể nào, thì việc tiêm lần thứ ba được tiến hành với kháng thể khác. Chip cảm biến sau đó được tái sinh bằng một lần tiêm dung dịch đệm tái sinh trong thời gian 30 giây. Các kháng thể và c-Met-Fc được bỏ đi ở giai đoạn này.

Phân tích các kết quả:

Khả năng của kháng thể “A” ức chế sự gắn kết của kháng thể “B” được tính toán bằng tỷ lệ  $BIA/C = (R2A/B/R1B) \times 100$ : trong đó  $R2A/B$  là đáp ứng tương ứng với sự gắn kết của MAb “B” khi nó được phun sau khi Mab “A” và  $R1B$  là đáp ứng tương ứng với sự gắn kết của MAb “B” khi nó được phun lần thứ nhất.  $BIA/C$  nhỏ hơn 20% có nghĩa là A có thể ức chế sự gắn kết của B sao cho A và B có vị trí liên kết cạnh nhau.

Việc lập bản đồ epitop được tiến thành với 2 Mab, 11E1 và 5D5.

**Bảng 3**

|                        |             |              |
|------------------------|-------------|--------------|
| 2 <sup>nd</sup> Ab (B) |             | 5D5          |
| 1 <sup>st</sup> Ab (A) | 11E1        |              |
| 11E1                   | <u>6,5%</u> | 84,2%        |
| 5D5                    | 98,4%       | <u>11,0%</u> |

Việc hình dung sự gắn kết khoảng 270RU của c-Met-Fc bị hút vào bằng các lần tiêm 2 phút liên tiếp các Mab 5D5 (thứ nhất), 5D5 (thứ hai) và 11E1 (thứ ba) ở nồng độ bằng 10 µg/ml đã chứng minh rằng 5D5 và 11E1 gắn kết một cách rõ ràng với hai vị trí cách xa (Fig.5A). Sự quan sát này được xác nhận bằng trình tự nghịch đảo của kháng thể (Fig.5B).

Bảng 3 đã tóm tắt tỷ lệ tính toán thu được với các trình tự khác nhau của 2 kháng thể này. Các giá trị đen (trên 75%) có nghĩa là Mab A không ức chế gắn kết

Mab B. Các giá trị đậm/nghiêng (dưới 20%) có nghĩa là vị trí liên kết của cả hai kháng thể (A và B) là giống nhau hoặc đủ gần nhau để không thể gắn kết đồng thời.

#### Ví dụ 3: Tác dụng của Mabs đến quá trình phosphoryl hóa c-Met

Để xác định hoạt tính của các kháng thể kháng c-Met đến quá trình phosphoryl hóa c-Met, thử nghiệm phospho c-Met ELISA được thiết lập. Vắn tắt, 500 000 tế bào A549 được cho vào mỗi lỗ của các đĩa có 6 lỗ trong môi trường F12K + 10% FCS. 16 giờ trước khi bổ sung HGF (100 ng/ml), các tế bào được bỏ đói và mỗi kháng thể cần được thử nghiệm được bổ sung ở nồng độ cuối bằng 30 µg/ml 15 phút trước khi kích thích phối tử. 15 phút sau khi bổ sung HGF, dung dịch đệm phân giải lạnh được bổ sung, các tế bào được cạo lấy và dịch tan tế bào được thu gom và được ly tâm ở tốc độ 13 000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi bề mặt được xác định bằng kit BCA (Pierce) và được cất giữ ở -20°C. Đối với thử nghiệm ELISA, kháng thể đề kháng c-Met (R&D ref. AF276) được sử dụng làm kháng thể bắt giữ (phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C) và sau bước làm bão hòa (1 h ở nhiệt độ trong phòng) bằng dung dịch đệm TBS-BSA 5%, 25 µg protein từ dịch tan tế bào khác được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ. Sau 90 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, các đĩa được rửa bốn lần và kháng thể kháng phospho-c-Met (c-Met thổ kháng pY1230-1234-1235) được bổ sung. Sau khi ủ thêm 1 giờ và rửa 4 lần, HRP kháng thổ (Biosource) được bổ sung trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó cơ chất Luminol được bổ sung vào trước khi đánh giá sự phát quang bằng thiết bị Mithras. Các kết quả được thể hiện trên Fig.6B đã chứng minh rằng 11E1, 224G11, 223C4 và 227H1 ức chế quá trình phosphoryl hóa c-Met lần lượt bằng 68, 54, 80 và 65% so với Mab 5D5 có khả năng ức chế quá trình phosphoryl hóa c-Met yếu hơn (42%). Trong thử nghiệm này, tác dụng cơ sở yếu (nhỏ hơn 20%) được quan sát với 4 kháng thể tham dự (Fig.6A). Như được mô tả trong các ví dụ khác nhau được thể hiện trong đơn yêu cầu cấp patent này, tác dụng cơ sở yếu này không tác động gì đến hoạt tính của các kháng thể trong các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* khác. 5D5 được sử dụng làm kháng thể đối chứng đã được thể hiện tác dụng cơ sở đáng kể trong thử nghiệm này.

#### Ví dụ 4: Thay thế HGF được đánh dấu phóng xạ của các kháng thể kháng c-Met

Để xác định các kháng thể kháng c-Met có khả năng thay thế HGF, thử

nghiệm gắn kết được thiết lập. Vắn tắt, các vi đĩa có 96 lỗ protein A FlashPlate (Perkin Elmer) được làm bão hoà bằng 0,5% gelatin trong PBS (200  $\mu$ l/lỗ, 2 h ở nhiệt độ trong phòng) trước khi bổ sung c-Met-Fc tái tổ hợp (R&D Systems) làm protein phủ. 2000 $\mu$ l dung dịch 1  $\mu$ g/ml c-Met-Fc trong PBS được bổ sung vào mỗi lỗ. Sau đó, các đĩa được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Các vị trí Protein A còn lại tự do được làm bão hoà thêm bằng hIgG không liên quan (0,5  $\mu$ g/lỗ trong PBS) trong 2 h ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa bằng PBS sau mỗi bước.

Đối với các thử nghiệm cạnh tranh, sự gắn kết [ $^{125}$ I]-HGF (hoạt tính đặc hiệu  $\sim 2,000$  Ci/mmol) ở 200 pM để cố định c-Met được đo với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của các kháng thể đơn dòng kháng c-Met 11E1, 224G11, 223C4, 227H1 hoặc HGF (R&D Systems) nằm trong khoảng từ 0,1 pM đến 1  $\mu$ M trong PBS pH=7,4. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 6 h, sau đó được đếm trên máy đếm nhấp nháy vi đĩa Packard Top Count. Sự gắn kết không đặc hiệu được xác định với sự có mặt của 1  $\mu$ M HGF. Kháng thể đơn dòng 9G4, không hướng vào c-Met, nhưng nhận biết đặc hiệu protein *E. coli*, được sử dụng làm kháng thể đối chứng isotyp IgG1 chuột nhắt.

Phản trăm gắn kết đặc hiệu [ $^{125}$ I]-HGF tổng được thể hiện trên theo nồng độ phối tử trên các đồ thị bán lôga. Nồng độ của các chất ức chế khác nhau cần thiết để ức chế sự gắn kết phối tử phóng xạ bằng 50% ( $IC_{50}$ ) được xác định trên đồ thị từ các đường cong cạnh tranh hình xích ma thu được (Fig.7A và Fig.7B).

Như mong đợi, HGF không được đánh dấu phóng xạ có thể thay thế một cách hoàn toàn gắn kết [ $^{125}$ I]-HGF với c-Met được cố định, trong khi kháng thể đối chứng 9G4 không cho thấy hoạt tính ức chế HGF bất kỳ (Fig.7A và Fig.7B). Các kháng thể kháng c-Met đơn dòng 11E1, 224G11, 223C4 và 227H1 có thể ức chế gắn kết [ $^{125}$ I]-HGF với c-Met cố định, lần lượt với các giá trị  $IC_{50}$  bằng 20 nM, 3 nM, 2,7 nM và 5,8 nM. Các giá trị  $IC_{50}$  được xác định đối với các kháng thể 224G11, 223C4 và 227H1 có thể được so sánh với giá trị  $IC_{50}$  được xác định đối với HGF không được đánh dấu phóng xạ, nằm trong khoảng từ 3 đến 5 nM, trong khi kháng thể 11E1 có giá trị  $IC_{50}$  cao hơn.

#### Ví dụ 5: Ức chế sự xâm lấn của các kháng thể kháng c-Met

Để đánh giá tác dụng ức chế của các kháng thể kháng c-Met đến sự xâm lấn, các tế bào A549 được cho vào trong buồng bên trên trong các buồng xâm lấn BD BioCoat<sup>TM</sup> Matrigel<sup>TM</sup> (các lỗ có đường kính 6,5 mm có các màng

polycarbonat có kích thước 8  $\mu\text{m}$ ). Các tế bào A459 được bỏ đói 24 giờ trước khi thực hiện thử nghiệm xâm lấn. Sau đó, 500 000 tế bào A549 được cho vào dung dịch đệm hóa ứng động (môi trường DMEM, 0,1% BSA, 12 mM Hepes) trong lỗ phía trên của mỗi buồng, khi phủ Matrigel có hoặc không có kháng thể cần được thử nghiệm (nồng độ Mab cuối bằng 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Sau 1 giờ ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C với 5%  $\text{CO}_2$ , các buồng bên dưới được nạp đầy môi trường phát triển chứa 400 ng/ml rhHGF hoặc với một mình môi trường phát triển. Các buồng này được ủ thêm 48 ở nhiệt độ 37°C với 5%  $\text{CO}_2$ . Vào cuối thời gian ủ này, các tế bào vẫn ở trên bề mặt trên của màng lọc được loại bỏ một cách nhẹ nhàng bằng chổi bông, các tế bào di chuyển đến bề mặt dưới của màng lọc được phân giải, được nhuộm bằng dung dịch đệm thuốc nhuộm CyQuant GR (Invitrogen) và được đếm bằng cách sử dụng máy đọc huỳnh quang Berthold Mithras LB940. Tất cả các điều kiện được thử nghiệm làm 3 lần.

Như dự đoán, HGF gây ra sự xâm lấn đáng kể của các tế bào khối u có thể được so sánh với sự xâm lấn được quan sát với 10% FCS được đưa vào dưới dạng đối chứng dương (Fig.8). IgG1 9G4 chuột được đưa vào dưới dạng đối chứng isotyp là không có tác dụng đáng kể đến sự xâm lấn sơ sở hoặc do HGF gây ra khi so với các tế bào được cho vào đĩa mà không có IgG. Không một tác dụng chủ vận nào được nhận thấy với 11E1, 224G11, 223C4 và 227H1 khi được bổ sung một mình và sự ức chế đáng kể và có thể so sánh được của sự xâm lấn do HGF gây ra được quan sát với 3 Mab.

#### Ví dụ 6: Ức chế sự hồi phục vết thương của các kháng thể kháng c-Met

HGF kích thích tính linh động. Để xác định xem các kháng thể kháng HGF có thể ức chế sự di chú, các tế bào NCI-H441 được cho sinh trưởng đến khi có được mật độ cao và một khe được đưa vào bằng đầu pipet P200. Sau đó, các tế bào được kích thích để di chuyển qua khe này bằng HGF (100 ng/ml) với sự có mặt hoặc không có mặt của 11E1. Các lỗ chỉ có 11E1 cũng được đánh giá. Mỗi điều kiện được thử nghiệm được đánh giá làm 6 lần và 3 thử nghiệm độc lập được tiến hành. Sau khi ủ qua đêm, các tế bào được hiển thị bằng Axio Vision Camera (vật kính x4).

HGF gây ra sự di chú đáng kể làm phủ kín hoàn toàn khe trong vòng một đêm (Fig.9). IgG1 không thích hợp 9G4 được sử dụng làm đối chứng isotyp mà không có tác dụng bất kỳ đến sự di trú tế bào. Như mong đợi, tác dụng chủ vận

được quan sát với 5D5 khi được bổ sung một mình nhưng sự ức chế đáng kể của di trú tế bào được quan sát với kháng thể này với sự có mặt của HGF trong phần khe vẫn hờ. Đoạn Fab của 5D5 không có tác dụng chủ vận bất kỳ khi được bổ sung một mình. Tuy nhiên, không quan sát thấy hoạt tính của đoạn này khi có mặt HGF. Như được quan sát với đối chứng isotyp 9G4, MAb 11E1 không có tác dụng chủ vận khi được bổ sung một mình và có tác dụng như là chất đối kháng hoàn toàn với sự có mặt của HGF.

#### Ví dụ 7: Thử nghiệm phân tán

Các tế bào SK-HEP-1 được cho vào lỗ với mật độ thấp ( $1,10^4$  tế bào/lỗ) trong đĩa có 24 lỗ trong DMEM với 10% FCS và đồng thời được cho sinh trưởng trong thời gian 24 giờ trước khi bổ sung HGF (100 ng/ml) và các kháng thể để được thử nghiệm (10  $\mu$ g/ml). Sau khi ủ 72 giờ, các cụm tế bào được cố định và được nhuộm bằng violet tinh thể 0,2% trong metanol và được đánh giá sự phân tán bằng trực quan. Mỗi điều kiện được thử nghiệm được thử nghiệm làm ba lần và 3 thử nghiệm độc lập được tiến thành.

Việc bổ sung HGF vào các tế bào SK-HEP-1 gây ra sự phân tán tế bào đáng kể (Fig.10A và Fig.10B). Kháng thể 9G4 được đưa vào dưới dạng đối chứng isotyp là không có tác dụng một mình hoặc với sự có mặt của HGF. Như mong đợi, kháng thể 5D5 đã biểu hiện tác dụng chủ vận đáng kể một mình và không có tác dụng ức chế nào được quan sát khi 5D5 được bổ sung HGF (Fig.10A). Không quan sát thấy tác dụng chủ vận nào với 11E1 (Fig.10A) hoặc với 224G11 (Fig.10B) được bổ sung một mình. Tác dụng ức chế rất đáng kể của kháng thể này có đã được thể hiện với sự có mặt của HGF (Fig.10A và Fig.10B).

#### Ví dụ 8: Thử nghiệm tạo ống ba chiều

Các tế bào SK-HEP-1 được cho vào các lỗ với mật độ  $1,10^4$  tế bào/lỗ trong đĩa có 24 lỗ trong DMEM với 10% FCS/Matrigel (50/50) và được ủ trong thời gian 30 phút trước khi bổ sung, đồng thời, HGF (100 ng/ml) và các kháng thể để thử nghiệm (10  $\mu$ g/ml). Sau 7 ngày ủ, các tế bào được đánh giá mức độ tạo ống bằng trực quan. Mỗi điều kiện được thử nghiệm được thử nghiệm làm ba lần và 3 thử nghiệm độc lập được tiến thành.

Việc bổ sung HGF đã gây ra sự tạo ống SK-HEP-1 đáng kể (Fig.11). Kháng thể 9G4 được đưa vào dưới dạng đối chứng isotyp là không có tác dụng

một mình hoặc với sự có mặt của HGF. Như mong đợi, kháng thể 5D5 đã biểu hiện tác dụng chủ vận đáng kể một mình và không một tác dụng ức chế nào được quan sát khi 5D5 được bổ sung HGF. Không một tác dụng chủ vận nào được quan sát với 11E1, 223C4 và 224G11 được bổ sung một mình và tác dụng ức chế hoàn toàn được thể hiện với cả hai 11E1 và 223C4 với sự có mặt của HGF. Sự ức chế một phần nhưng đáng kể được quan sát với 224G11Mab.

#### Ví dụ 9: Sự tạo thành khối phỏng cầu

Để đánh giá khả năng của các kháng thể kháng c-Met trong việc ức chế *in vitro* sự phát triển của khối u, trong mô hình thử nghiệm gần giống với mô hình thử nghiệm *in vivo*, khối phỏng cầu của U-87MG, tế bào u nguyên bào xốp người (ATCC # HTB-14) được tạo ra. Các tế bào được sinh trưởng dưới dạng lớp đơn được tách ra bằng trypsin-EDTA và được tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào đầy đủ (DMEM) có bổ sung 10% FBS. Các khối phỏng cầu được bắt đầu bằng cách đưa 625 tế bào vào từng lỗ của các đĩa có 96 lỗ đáy tròn trong DMEM-10% FCS. Để ngăn không cho tế bào bám dính vào đáy, các đĩa được phủ trước bằng polyHEMA trong 95% etanol và không khí được làm khô ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được ủ trong các điều kiện dịch nuôi cấy tế bào chuẩn ở nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong tủ áp được điều ẩm. Các kháng thể đơn dòng đã được tinh chế (10 µg/ml) được bổ sung sau từ 3 đến 7 ngày sau khi nuôi cấy khối phỏng cầu. HGF (400 ng/ml) được bổ sung một lần sau khi nuôi cấy được 4 ngày. Các khối phỏng cầu được giữ trong môi trường nuôi cấy trong thời gian ít nhất 10 ngày. Sau đó, sự phát triển khối phỏng cầu được kiểm tra bằng cách đo diện tích khối phỏng cầu bằng cách sử dụng buồng tự đo cài phần mềm AxioVision. Diện tích được biểu thị bằng µm<sup>2</sup>. 8-16 khối phỏng cầu được đánh giá đối với mỗi điều kiện.

Fig.12A và Fig.12B đã cho thấy rằng với sự có mặt của 10% FCS, không quan sát thấy sự kích thích nào khi HGF được bổ sung vào môi trường đầy đủ này. Như mong đợi, đối chứng isotyp 9G4 là không có tác dụng đến sự phát triển khối phỏng cầu. 11E1 và 223C4 làm giảm một cách đáng kể sự phát triển khối phỏng cầu khi có mặt cũng như khi không có mặt của HGF. Không quan sát thấy tác dụng nào với đoạn Fab 5D5.

#### Ví dụ 10: Hoạt tính *in vivo* của Mab kháng c-Met trong mô hình thử nghiệm di

ghép U87MG

Chuột nhắt không có tuyến ức từ 6 đến 8 tuần tuổi được nhốt vào các chuồng bên trên có lắp bộ lọc khử trùng, được duy trì trong các điều kiện vô trùng và được thao tác bằng tay theo các hướng dẫn của Pháp và châu Âu. U87-MG, dòng tế bào u nguyên bào xốp, biểu hiện c-Met và tự tiết phối tử HGF, được chọn để đánh giá *in vivo*. Chuột nhắt được tiêm dưới da  $5 \times 10^6$  tế bào. Sau đó, 6 ngày sau khi cấy tế bào dưới da, các khối u có thể đo được (xấp xỉ  $100 \text{ mm}^3$ ), các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có kích thước khối u có thể sánh ngang nhau và được xử lý hai lần mỗi tuần với liều lượng 1 mg mỗi kháng thể cần được thử nghiệm. Sau đó, các con này được quan sát tốc độ phát triển mảnh dị ghép và sự thay đổi thể trọng. Thể tích khối u được tính toán bằng cách công thức:  $p(\text{Pi})/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$ .

Các kết quả thu được được tóm tắt trên Fig.13 và đã chứng minh rằng tất cả các kháng thể được thử nghiệm đã ức chế một cách đáng kể sự phát triển *in vivo* của các tế bào U87-MG. Việc sử dụng kháng thể kháng IGF-1R (IgG1) trung hoà ở ô A cho thấy rằng sự ức chế *in vivo* quan sát được là có liên quan đặc biệt đến sự biến đổi của trục HGF-cMet.

Ví dụ 11: Hoạt tính *in vivo* của Mab kháng c-Met trong mô hình dị ghép NCI-H441

NCI-H441 thu được từ adenocarcinom phổi hình chấm, biểu hiện c-Met ở mức cao, và cho thấy quá trình phosphoryl hóa cơ định của c-Met RTK.

Để xác định xem dòng tế bào này biểu hiện c-Met ở mức cao và có thể tạo ra HGF, cả định lượng RT-PCR lẫn FACS hoặc ELISA (Quantikine HGF; R&D systems) đều được tiến hành. Để định lượng RT-PCR, mức biểu hiện sản phẩm phiên mã HGF hoặc cMet tổng trong các dòng tế bào được đánh giá bằng cách định lượng PCR sử dụng kỹ thuật TaqMan<sup>TM</sup> chuẩn. Các mức sản phẩm phiên mã HGF hoặc c-Met được làm chuẩn hoá với protein Ribosom gen housekeeping, lớn, P0 (RPL0) và các kết quả được biểu hiện dưới dạng giá trị biểu hiện chuẩn hoá (phương pháp 2-ddCT).

Bộ đoạn mỗi/đoạn dò đối với RPL0 là xuôi, 5'-gaaactctgcattctcgttctctg-3' (SEQ ID No. 47); ngược, 5'-aggactcggttggtaccgttgga-3' (SEQ ID No. 48); và đoạn dò, 5'-(FAM)-tgcagattggctacccaactgttgca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 49). Bộ đoạn mỗi/đoạn dò đối với HGF là xuôi, 5'-aacaatgcctctggttcc-3' (SEQ ID No.

50);

ngược, 5'-ctttagctgcgtcctttac-3' (SEQ ID No. 51); và đoạn dò, 5'-(FAM)-ccttcaatagcatgtcaagtggagtga-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 52). Bộ đoạn môi/đoạn dò

đối với cMet là xuôi, 5'-cattaaaggagacctcaccatagcta-3' (SEQ ID No. 53); ngược, 5'-cctgatcgagaaaccacaacct-3' (SEQ ID No. 54); và đoạn dò, 5'-(FAM)-catgaagcgaccctctgatgtcca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 55). Quy trình tuần hoàn nhiệt bao gồm việc làm nóng chảy ở 50°C trong thời gian 2 phút và 95°C trong 10 phút, tiếp đó là 40 chu trình ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 15 giây và 62°C trong thời gian 1 phút.

Không một ARN thông tin nào đối với HGF được phát hiện thấy trong NCI-H441 (Fig.14) và HGF là không thể phát hiện được bằng ELISA trong dịch nổi bề mặt NCI-H441. Trong các thử nghiệm này, U87-MG, dòng tế bào u nguyên bào xóp đã biết là dòng tế bào tự tiết của HGF, được đưa vào dưới dạng đối chứng dương. Phân tích RT-PCR đã cho thấy mức đáng kể ARN thông tin của HGF trong U87-MG và 1,9 ng HGF/triệu tế bào được phát hiện thấy trong dịch nổi bề mặt của các tế bào U87-MG. Cả phân tích RT-PCR định lượng lẫn FACS, Fig.15A và Fig.15B đã chứng minh rằng như mong đợi các tế bào NCI-H441 đã được biểu hiện quá mức một cách đáng kể c-Met và sự biểu hiện này cao hơn nhiều so với mức biểu hiện được quan sát đối với các tế bào U87-MG. Trong thử nghiệm này, dòng tế bào MCF-7 được đưa vào dưới dạng đối chứng âm. NCI-H441 thể hiện dưới dạng dòng tế bào hoạt hóa cơ định không tự tiết có thể phát triển không phụ thuộc vào phối tử HGF, trong đó quá trình dime hoá không phụ thuộc vào phối tử của c-met xảy ra do sự biểu hiện quá mức của thụ thể này.

Việc đánh giá các kháng thể kháng c-met về hoạt tính *in vivo* của dòng tế bào không tự tiết này có thể hiểu thấu được về tiềm năng của chúng trong việc tác động đến quá trình dime hoá c-Met.

Fig.16 cho thấy rằng 224G11, 11E1 và 227H1 đã ức chế một cách đáng kể sự phát triển *in vivo* của NCI-H441, đã gợi ý rằng ngoài ức chế phụ thuộc phối tử, các kháng thể này có thể ức chế quá trình dime hoá là cũng có thể định hướng ức chế không phụ thuộc vào phối tử của c-met. Như được đề cập trong phần mô tả trên đây, với đặc tính vừa nêu, 224G11, 11E1 và 227H1 đã thể hiện là khác với kháng thể kháng c-Met một nhánh 5D5 (OA-5D5).



Ví dụ 12: Quy trình làm tương thích với người bằng cách ghép CDR kháng thể 224G11

#### I - Làm miễn thay đổi của chuỗi nhẹ tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của 224G11VL với gen dòng tế bào mầm của chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VL 224G11 được so sánh với phần trình tự gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Gen dòng tế bào mầm IGKV3-5\*01 và IGKJ4\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 99,31% đối với vùng V và 94,28% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp các trình tự 224G11VL để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig.17A đối với gen V và Fig.17B đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của 224G11VL với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với 224G11VL được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của 224G11VL được sắp thẳng hàng với phần trình tự gen dòng tế bào mầm của người của dữ liệu IMGT. Để tối ưu hoá việc chọn lọc, việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein được tiến hành để nghiên cứu độ tương đồng cao hơn.

Hai phương pháp bổ sung này dùng để nhận biết hai trình tự V người nhận có thể đối với CDR VL 224G11 của chuột. Việc sắp thẳng hàng nucleotit tạo ra gen dòng tế bào mầm IGKV3-11\*01 người có độ giống về trình tự là 75,99%, trong khi việc sắp thẳng hàng protein tạo ra gen dòng tế bào mầm IGKV4-1\*01 người có độ giống về trình tự là 67,30%. Cần chú ý rằng trong cả hai trường hợp, hai gen dòng tế bào mầm gần giống nhau nhất và các trình tự đã được phân tích đã thể hiện các chiều dài axit amin CDR1 khác nhau (10 axit amin trong VL 224G11; 6 axit amin trong IGKV3-11\*01; 12 axit amin trong IGKV4-1\*01).

Đối với vùng J, điểm số cho mức độ tương đồng cao nhất trước tiên thu được với người, IGKJ3\*01 người có độ giống về trình tự là 80%. Nhưng đã phát hiện thấy số cao hơn của nucleotit giống nhau liên tiếp và độ phù hợp axit amin cao hơn trong khi sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 người (độ giống về trình tự là 77,14%). Do đó, gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 được chọn

làm vùng J người nhận đối với CDR VL 11E1 chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.18A đối với vùng V và 18B đối với vùng J.

*Phiên bản được làm tương thích với người của 224G11 VL*

Dựa vào khả năng của hai vùng V người nhận đối với các CDR VL 224G11 của chuột, hai phiên bản được làm tương thích với người của miền VL 224G11 sẽ được mô tả. Phiên bản thứ nhất tương ứng với thử nghiệm ban đầu đối với khung người có chiều dài CDR1 ngắn hơn (IGKV3-11\*01), phiên bản thứ hai có chiều dài CDR1 dài hơn (IGKV4-1\*01).

a) IGKV3-11\*01 được làm tương thích với người trên cơ sở phiên bản của VL 224G11

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm được chọn IGKV3-11\*01 và IGKJ4\*02 và cả các CDR của VL 224G11 của chuột với các khung của các trình tự gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.19A, các gốc in đậm trong trình tự VL 224G11 tương ứng với 25 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 224G11 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGKV3-11\*01 và IGKJ4\*02).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, sự gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, ba trong số 25 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị được đột biến. 3 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người là M39 chuột thành L người, H40 thành A và R84 thành G. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.19A là các gốc in đậm trong trình tự 224G11 HZ1VL, trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên cần được thử nghiệm là không bị hạn chế, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 15 (L/P), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) và 99 (V/F) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác,

toàn bộ 16 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 25 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.19A thể hiện VL 224G11 được thực hiện được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV3-11\*01 với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

b) phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV4-1\*01 của 224G11 VL

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm được chọn IGKV4-1\*01 và IGKJ4\*02 và cả các CDR của VL 224G11 của chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.19B, các gốc in đậm trong trình tự VL 224G11 tương ứng với 22 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 224G11 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGKV4-1\*01 và IGKJ4\*02).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, 4 trong số 22 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. 4 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người là L4 chuột thành M người, M39 thành L, H40 thành A và R84 thành G. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.19B dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 224G11 HZ2VL trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 25 (A/S), 66 (N/T), 67 (L/R), và 93 (P/S) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác, toàn bộ 14 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 22 axit amin khác nhau có thể

được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.19B thể hiện VL 224G11 được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV4-1\*01 đã được thực hiện với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

## II - Làm miễn thay đổi của chuỗi nặng tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VH 224G11 được so sánh với phần trình tự gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Gen dòng tế bào mầm IGHV1-18\*01, IGHD2-4\*01 và IGHJ2\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 92,70% đối với vùng V, 75,00% đối với vùng D và 89,36% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp các trình tự VH 224G11 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig. 20A đối với gen V, Fig.20B đối với gen D và Fig.20C đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VH 224G11 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VH 224G11 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VH 224G11 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phần trình tự của dữ liệu IMGT. Để tối ưu hoá việc chọn lọc, việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein được tiến hành để nghiên cứu độ tương đồng cao hơn.

Hai phương pháp bổ sung này dùng để nhận biết trình tự V IGHV1-2\*02 người nhận giống nhau đối với các CDR VH 224G11 của chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 75,00% ở mức nucleotit và 64,30% ở mức protein.

Cần chú ý rằng vùng D hoàn toàn thuộc về vùng CDR3 trong miền VH. Quy trình làm tương thích với người là dựa vào phương pháp “ghép CDR”. Phân tích các gen D gần nhất với người là không được sử dụng trong phương pháp này.

Để xác định độ tương đồng đối với vùng J dùng để nhận biết gen dòng tế

bào mầm IGHJ4\*04 người có độ giống về trình tự là 78,72%.

Do vậy, gen dòng tế bào mầm V IGHV1-2\*02 người và gen dòng tế bào mầm J IGHJ4\*01 người được chọn làm trình tự người nhận đối với các CDR VH 224G11 của chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.21A đối với vùng V và Fig.21B đối với vùng J.

*Phiên bản được làm tương thích với người của VH 224G11*

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 và IGHJ4\*01 được chọn và cả các CDR của VH 224G11 của chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.22, các gốc in đậm trong trình tự VH 224G11 tương ứng với 30 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VH 224G11 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGHV1-2\*02 và IGHJ4\*01).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, 4 trong số 30 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. 4 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phản tương ứng của chúng ở người là D51 chuột thành E người, G55 thành W, V80 thành R và K82 thành T. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.22 dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 224G11 HZVH trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 25 (T/A), 48 (E/Q), 49 (S/G), 53 (I/M), 76 (A/V), 78 (L/M) và 90 (D/E) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác, toàn bộ 19 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 30 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.22 thể hiện VH 224G11 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Ví dụ 13: Quy trình làm tương thích với người bằng cách ghép CDR kháng thể 227H1

I - Làm miễn thay đổi của chuỗi nhẹ tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của VL 227H1 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VL 227H1 được so sánh với phân trình tự với gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Các gen dòng tế bào mầm IGKV3-5\*01 và IGKJ4\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 96,90% đối với vùng V và 97,29% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp trình tự VL 227H1 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig. 23A đối với gen V và Fig.23B đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VL 227H1 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VL 227H1 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VL 227H1 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phân trình tự của dữ liệu IMGT. Để tối ưu hoá việc chọn lọc, việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein được tiến hành để nghiên cứu độ tương đồng cao hơn.

Hai phương pháp bổ sung này dùng để nhận biết hai trình tự V người nhận có thể đối với CDR VL 227H1 của chuột. Sắp thẳng hàng nucleotit tạo ra gen dòng tế bào mầm IGKV3-11\*01 người có độ giống về trình tự lần lượt là 74,91% trong khi việc sắp thẳng hàng protein tạo ra gen dòng tế bào mầm IGKV4-1\*01 người có độ giống về trình tự lần lượt là 64,00%. Cần chú ý rằng trong cả hai trường hợp, hai gen dòng tế bào mầm gần nhau nhất và các trình tự đã được phân tích cho thấy các chiều dài axit amin CDR1 khác nhau (10 axit amin trong VL 227H1; 6 axit amin trong IGKV3-11\*01; 12 axit amin trong IGKV4-1\*01).

Đối với vùng J, điểm số mức độ tương đồng cao nhất trước tiên thu được với người, IGKJ3\*01 người có độ giống về trình tự là 78,38%. Nhưng đã phát

hiện thấy số cao hơn của nucleotit giống nhau liên tiếp và độ phù hợp axit amin cao hơn trong khi sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 người (độ giống về trình tự là 75,68%). Do đó, gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 được chọn làm vùng J người nhận đối với CDR VL 227H1 của chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.24A đối với vùng V và Fig.24B đối với vùng J.

*Phiên bản được làm tương thích với người của 224G11 VL*

Dựa vào khả năng của hai vùng V người nhận đối với các CDR VL 227H1 của chuột, hai phiên bản được làm tương thích với người của miền VL 227H1 sẽ được mô tả. Phiên bản thứ nhất tương ứng với thử nghiệm ban đầu đối với khung người có chiều dài CDR1 ngắn hơn (IGKV3-11\*01), phiên bản thứ hai có chiều dài CDR1 dài hơn (IGKV4-1\*01).

a) phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV3-11\*01 của VL 227H1

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm được chọn IGKV3-11\*01 và IGKJ4\*02 và cả các CDR của VL 227H1 của chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.25A, các gốc in đậm trong trình tự VL 227H1 tương ứng với 26 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 227H1 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGKV3-11\*01 và IGKJ4\*02).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, ba trong số 26 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. Ba gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người là I39 chuột thành người L, H40 thành A và R84 thành G. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.25A dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 227H1 HZ1VL, trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 15 (L/P), 25 (V/A), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) và 99 (S/F) trên đó các đột biến cũng có thể

được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác, toàn bộ 16 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 25 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.25A thể hiện IGKV3-11\*01 được thực hiện được làm tương thích với người trên cơ sở VL 227H1 với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

b) phiên bản được làm tương thích với người trên cơ sở IGKV4-1\*01 của VL 227H1

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm được chọn IGKV4-1\*01 và IGKJ4\*02 và cả các CDR của chuột VL 227H1 với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.25B, các gốc in đậm trong trình tự VL 227H1 tương ứng với 24 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 227H1 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGKV4-1\*01 và IGKJ4\*02).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, 4 trong số 24 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. 4 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người là L4 chuột thành người M, I39 thành L, H40 thành A và R84 thành G. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.25B dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 227H1 HZ2VL, trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 25 (V/S), 66 (N/T), 67 (L/R), và 93 (P/S) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.



Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác, toàn bộ 16 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 22 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.25B thể hiện IGKV4-1\*01 được thực hiện được làm tương thích với người trên cơ sở VL 227H1 với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

## II - Làm miễn thay đổi của chuỗi nặng tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VH 227H1 được so sánh với phần trình tự với gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Các gen dòng tế bào mầm IGHV1-18\*01, IGHD1-1\*02 và IGHJ2\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 92,70% đối với vùng V, 63,63% đối với vùng D và 91,48% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp các trình tự VH 227H1 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig.26A đối với gen V, Fig.26B đối với gen D và Fig.26C đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VH 227H1 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VH 224G11 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VH 227H1 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phần trình tự của dữ liệu IMGT. Do vậy, xác định được trình tự V IGHV1-2\*02 người nhận đối với các CDR VH 224G11 của chuột có độ giống về trình tự là 72,92%.

Cần chú ý rằng vùng D hoàn toàn thuộc về vùng CDR3 trong miễn VH. Quy trình làm tương thích với người là dựa vào phương pháp “ghép CDR”. Phân tích các gen D gần nhất với người là không được sử dụng trong phương pháp này.

Để xác định độ tương đồng đối với vùng J dùng để nhận biết gen dòng tế

bào mầm IGHJ4\*01 người có độ giống về trình tự là 78,72%.

Do vậy, gen dòng tế bào mầm V IGHV1-2\*02 người và gen dòng tế bào mầm J IGHJ4\*01 người được chọn làm trình tự người nhận đối với các CDR VH 227H1 của chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.27A đối với vùng V và Fig.27B đối với vùng J.

Để tối ưu hoá việc chọn lọc, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể thực hiện việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein để trợ giúp cho việc chọn lọc này.

*Phiên bản được làm tương thích với người của VH 227H1*

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm được chọn IGHV1-2\*02 và IGHJ4\*01 và cả các CDR VH 227H1 của chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.28, các gốc in đậm trong trình tự VH 227H1 tương ứng với 32 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VH 227H1 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGHV1-2\*02 và IGHJ4\*01).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, 6 trong số 32 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. 6 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phản tương ứng của chúng ở người là chuột L39 thành M người, N40 thành H, L55 thành W, T66 thành N, V80 thành R và K82 thành T. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.28 dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 227H1 HZVH, trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 48 (K/Q), 49 (T/G), 53 (I/M), 76 (A/V) và 78 (L/M) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên

khác, toàn bộ 21 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 30 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.28 thể hiện VH 227H1 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Ví dụ 14: Quy trình làm tương thích với người bằng cách ghép CDR kháng thể 223C4

I - Làm miễn thay đổi của chuỗi nhẹ tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của VL 223C4 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VL 223C4 được so sánh với phân trình tự với gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Các gen dòng tế bào mầm IGKV12-46\*01 và IGKJ2\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 99,64% đối với vùng V và 94,59% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp trình tự VL 223C4 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig.29A đối với gen V và Fig.29B đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VL 223C4 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VL 223C4 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VL 223C4 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phân trình tự của dữ liệu IMGT.

Các gen dòng tế bào mầm IGKV1-NL1\*01 và IGKJ2\*01 người có độ giống về trình tự lần lượt là 78,49% đối với vùng V và 81,08% đối với vùng J được xác định. Do vậy, các gen dòng tế bào mầm IGKV1-NL1\*01 đối với vùng V và IGKJ2\*01 đối với vùng J được chọn làm trình tự người nhận đối với các CDR VL 223C4 chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.30A đối với vùng V và Fig.30B đối với vùng J.

Để tối ưu hoá việc chọn lọc, người có hiệu biết trung bình trong lĩnh vực

kỹ thuật này cũng có thể thực hiện việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein để trợ giúp cho việc chọn lọc này.

*Phiên bản được làm tương thích với người của VL 223C4*

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết các trình tự của gen dòng tế bào mầm được chọn IGKV1-NL1\*01 và IGKJ2\*01 và cả các CDR của VL 223C4 chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Ở giai đoạn này của quy trình, mô hình phân tử của miền Fv chuột 223C4 có thể được phát triển và được sử dụng để lựa chọn các gốc chuột cần được bảo toàn do vai trò của chúng trong việc duy trì của cấu trúc ba chiều của phân tử hoặc ở vị trí và chức năng gắn kết kháng nguyên. Cụ thể hơn, 9 gốc cuối cùng bị đột biến được xác định.

Trong bước thứ nhất, các gốc tham gia vào các liên kết hoặc cấu trúc CDR sẽ được thử nghiệm. Các gốc như vậy là các gốc 66 (R/N) và các gốc 68 (E/V).

Trong bước thứ hai, các gốc được tiếp xúc với dung môi, và để sao cho có thể bao gồm tính sinh miễn dịch, sẽ cũng được thử nghiệm. Các gốc này là các gốc 49 (A/S), 51 (K/Q), 69 (S/D), 86 (D/Q) và 92 (S/N).

Sau đó, trong bước thứ ba, các gốc tham gia vào cấu trúc/cuộn gấp miền thay đổi cũng có thể bị đột biến. Các gốc này là các gốc 46 (P/Q) và các gốc 96 (P/S).

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc sau, tức là các gốc 9 (S/A), 13 (A/V), 17 (D/E), 18 (R/T), 54 (L/V), 88 (T/S), 90 (T/K), 100 (A/G) và 101 (T/S), trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.31 thể hiện VL 223C4 được làm tương thích với người với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

## II - Làm miền thay đổi của chuỗi nặng tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VH 223C4 được so sánh với phần

trình tự với gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Các gen dòng tế bào mầm IGHV1-18\*01, IGHD6-3\*01 và IGHJ4\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 98,95% đối với vùng V, 72,72% đối với vùng D và 98,11% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp các trình tự VH 223C4 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig.32A đối với gen V, Fig.32B đối với gen D và Fig.32C đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VH 223C4 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VH 223C4 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VH 223C4 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phần trình tự của dữ liệu IMGT.

Các gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02, IGHD1-26\*01 và IGHJ6\*01 người có độ giống về trình tự lần lượt là 76,38% đối với vùng V, 75,00% đối với vùng D và 77,41% đối với vùng J được xác định. Các gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 đối với vùng V và IGHJ6\*01 đối với vùng J do vậy được chọn làm trình tự người nhận đối với CDR VH 223C4 chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.33A đối với vùng V, Fig.33B đối với vùng D và Fig.33C đối với vùng J.

Để tối ưu hoá việc chọn lọc, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể thực hiện việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein để trợ giúp cho việc chọn lọc này.

*Phiên bản được làm tương thích với người của VH 223C4*

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết được chọn các trình tự của gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 và IGHJ6\*01 và cả các CDR VH 223C4 chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Ở giai đoạn này của quy trình, mô hình phân tử của miền Fv chuột 223C4 có thể được phát triển và được sử dụng để lựa chọn các gốc chuột cần được bảo toàn do vai trò của chúng trong việc duy trì của cấu trúc ba chiều của phân tử hoặc ở vị trí và chức năng gắn kết kháng nguyên. Cụ thể hơn, 14 gốc cuối cùng bị đột biến được xác định.

Trong bước thứ nhất, các gốc tham gia vào các liên kết hoặc cấu trúc CDR sẽ được thử nghiệm. Các gốc như vậy là các gốc 40 (H/D), 45 (A/S), 55 (W/D), 66 (N/I) và 67 (Y/F).

Trong bước thứ hai, các gốc được tiếp xúc với dung môi, và để sao cho có thể bao gồm tính sinh miễn dịch, sẽ cũng được thử nghiệm. Các gốc này là các gốc 1 (Q/E), 3 (Q/L), 5 (V/Q), 48 (Q/M) và 80 (R/V).

Sau đó, trong bước thứ ba, các gốc tham gia vào cấu trúc/cuộn gấp miền thay đổi cũng có thể bị đột biến. Các gốc này là các gốc 9 (A/P), 13 (K/V), 22 (S/P) và 46 (P/H).

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc sau, tức là các gốc 12 (V/L), 21 (V/I), 43 (R/K), 49 (G/S), 53 (M/I), 68 (A/N), 72 (Q/K), 75 (R/K), 76 (V/A), 78 (M/L), 82 (T/K), 84 (I/S), 92 (S/R), 93 (R/S), 95 (R/T) và 97 (D/E), trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.34 thể hiện được làm tương thích với người VH 223C4 với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Ví dụ 15: Hoạt tính kháng khối u của MAb 224G11 của chuột một mình hoặc kết hợp với tác nhân điều trị hoá học Navelbine<sup>®</sup> trên mô hình khối u NCI-H441 dị ghép được thiết lập

Các phương pháp điều trị hoá học thành công phụ thuộc một phần vào đáp ứng tế bào với chết theo chương trình các tác nhân gây cảm ứng và sự cân bằng giữa các con đường bắt đầu và chống lại chết theo chương trình trong tế bào. Tác dụng bảo vệ của c-Met hoạt hóa đến sự sống sót của tế bào đã được báo cáo trong tài liệu. Điều này chủ yếu là do sự biểu hiện tăng của protein Bcl-xl và Bcl-2 chống lại sự chết theo chương trình là kết quả của việc truyền tín hiệu qua trung gian PI3-K làm ức chế hiện tượng chết theo chương trình phụ thuộc ty thể (caspase 9). Thực vậy, có thể thấy được rằng hệ HGF/c-Met với tác dụng điều hoà rõ ràng của nó đến quá trình chết theo chương trình cũng có thể ảnh hưởng độ

nhạy hoá chất của các tế bào ung thư. Giả thuyết này khi được thử nghiệm với Navelbine<sup>®</sup>, tác nhân điều trị hoá học có bán trên thị trường được sử dụng để điều trị bệnh ung thư phổi (Aapro *et al.*, Crit.Rev.Oncol.Hematol. 2001, 40:251-263; Curran *et al.*, Dugs Aging. 2002, 19:695-697). Mô hình NSCLC NCI-H441 dị ghép được sử dụng khi trước đó đã được mô tả rằng dòng tế bào này là nhạy cảm với cả Navelbine (Kraus-Berthier *et al.*, Clin.Cancer Res., 2000; 6:297-304) và c-Met dùng để điều trị (Zou H. T. *et al.*, Cancer Res. 2007, 67: 4408-4417).

Vấn tắt, các tế bào NCI-H441 thu được từ ATCC thường được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640, 10% FCS và 1% L-Glutamin. Các tế bào được phân chia hai ngày trước khi ghép sao cho chúng ở giai đoạn phát triển theo hàm số mũ. Mười triệu tế bào NCI-H441 trong PBS được cấy vào chuột nhắt trụi lông Thụy sĩ 7 tuần tuổi. Ba ngày sau khi cấy dưới da, các khối u được đo và các con vật được chia thành 4 nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có khối u với kích thước ngang nhau. Các con này được tiêm trong màng bụng với liều 2 mg 224G11/con và sau đó hai lần một tuần, trong thời gian 43 ngày, với 1 mg kháng thể/con. MAb 9G4 được sử dụng làm đối chứng isotyp.

Navelbine<sup>®</sup> được đưa vào chuột bằng cách tiêm trong màng bụng với liều 8 mg/kg vào ngày 5, 12, 19 sau khi tiêm tế bào. Để điều trị phối hợp với cả 224G11 và Navelbine<sup>®</sup>, hai hợp chất này được cấp một cách riêng biệt. Trong thử nghiệm này, 2 hợp chất này được sử dụng với liều lượng tối ưu của chúng. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần và được tính toán bằng công thức:  $p/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$ .

Fig.35 cho thấy rằng 224G11 có hiệu quả như Navelbine<sup>®</sup> khi được sử dụng một mình dưới dạng tác nhân điều trị đơn lẻ. Ưu điểm đáng kể của việc điều trị phối hợp được quan sát với sự thoái biến hoàn toàn khối u được quan sát thấy ở 3 trong số 6 con vào ngày 63.

#### Ví dụ 16: Chất ức chế c-Met và quá trình tạo mạch

Ngoài việc có vai trò trực tiếp trong quá trình điều hòa nhiều chức năng tế bào khối u, sự hoạt hóa của c-met cũng có liên quan đến sự tạo mạch khối u. Các tế bào nội mô biểu hiện c-Met và HGF kích thích sự phát triển, xâm lấn và sự di động của tế bào nội mô (Nakamura Y. *et al.*, Biochem. Biophys. Res., Commun. 1995, 215:483-488; Bussolino F. *et al.*, J. Cell Biol. 1992, 119:629-641). Sự điều

hòa phối hợp quá trình phát triển, xâm lấn và di động trong tế bào nội mô mạch bởi HGF/c-Met đã được chứng minh là làm tạo ra ống mao quản nội mô 3D *in vitro* (Rosen E.M. et al., Supplementum to Experientia 1991, 59:76-88).

Để xác định sự can thiệp tiềm năng của MAb kháng c-Met đến sự tạo mạch do HGF, hai thử nghiệm được tiến thành bao gồm i) đánh giá vai trò của MAb đến quá trình tăng sinh HUVEC và ii) thử nghiệm vai trò của MAb đến sự tạo ống HUVEC.

Đối với thử nghiệm tăng sinh, 7500 HUVEC được cho vào trong mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ trước đó được phủ bằng laminin. Các tế bào này được cho sinh trưởng 24 giờ trong môi trường thử nghiệm EMB-2 có bổ sung 0,5% FBS và heparin. Sau đó, MAb cần thử nghiệm (0,15-40 µg/ml) được bổ sung trong 1 h trước khi bổ sung 20 ng/ml HGF. Sau 24 giờ tiếp theo, các tế bào được tạo xung bằng 0,5 µCi [<sup>3</sup>H] Thymidin. Nồng độ [<sup>3</sup>H] thymidin được kết hợp được định lượng bằng cách đếm nhấp nháy chất lỏng. Trong thử nghiệm này, MAb 9G4 là kháng thể không liên quan được sử dụng làm đối chứng isotyp IgG1.

Các kết quả được biểu hiện dưới dạng dữ liệu chưa xử lý trên Fig.36 chứng tỏ rằng, như mong đợi, HGF là tác nhân gây cảm ứng tiềm năng của quá trình sinh trưởng tế bào HUVEC. Các kháng thể được đánh giá khi không có mặt HGF đã không biểu hiện hoạt tính tăng sinh chủ vận bất kỳ đến HUVEC với mọi liều thử nghiệm. Với sự có mặt của HGF, sự ức chế phụ thuộc mạnh vào liều lượng được quan sát đối với cả MAb 11E1 và 224G11.

Để đánh giá sự tạo ống HUVEC, 25000 tế bào được ủ 30 phút với các kháng thể cần được thử nghiệm được cho vào trong các đĩa có 48 lỗ được phủ bằng matrigel. Sau đó, HGF 50 ng/ml được bổ sung và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C. Môi trường sau đó được thu hoạch và 5 µM CMFDA được bổ sung vào trong 15 phút trước quan sát bằng kính hiển vi.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.37 đã chứng tỏ rằng, như mong đợi, HGF gây ra sự tạo ống đáng kể. Kháng thể 9G4 được đưa vào dưới dạng đối chứng isotyp IgG1 không có tác dụng bất kỳ đến sự tạo ống do HGF trong khi cả 11E1 và 224G11 đều ức chế mạnh sự tạo ống.

Ví dụ 17: Quy trình làm tương thích với người bằng cách ghép CDR kháng thể 11E1

I - Làm miễn thay đổi của chuỗi nhẹ tương thích với người



*So sánh trình tự nucleotit của VL 11E1 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VL 11E1 được so sánh với phần trình tự với gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Các gen dòng tế bào mầm IGKV4-79\*01 và IGKJ4\*01 chuột có độ giống về trình tự lần lượt là 98,58% đối với vùng V và 97,22% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp trình tự VL 11E1 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig.38A đối với gen V và Fig.38B đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VL 11E1 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VL 11E1 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VL 11E1 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phần trình tự của dữ liệu IMGT.

Xác định được IGKV3-7\*02 và IGKV3D-7\*01 người có độ giống về trình tự đối với cả hai gen dòng tế bào mầm là 69,86% đối với vùng V. Gen dòng tế bào mầm người IGKV3-7\*02 trong dữ liệu IMGT được gọi “ORF”, có nghĩa là trình tự này đã phát hiện thấy trong bộ gen người nhưng có thể có một số vấn đề tái tổ hợp dẫn đến các kháng thể tự nhiên thu được từ IGKV3-7\*02 không có chức năng. Do đó, gen dòng tế bào mầm IGKV3D-7\*01 được chọn làm vùng V người nhận đối với CDR VL 11E1 chuột.

Đối với vùng J, điểm số cho mức độ tương đồng cao nhất trước tiên thu được với người, IGKJ3\*01 người có độ giống về trình tự là 78,38%. Nhưng đã phát hiện thấy số cao hơn của nucleotit giống nhau liên tiếp và độ phù hợp axit amin cao hơn trong khi sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 người (độ giống về trình tự là 75,68%). Do đó, gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*02 được chọn làm vùng J người nhận đối với CDR VL 11E1 chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.39A đối với vùng V và Fig.39B đối với vùng J.

Để tối ưu hoá việc chọn lọc, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể thực hiện việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein để trợ giúp cho việc chọn lọc này.

*Phiên bản được làm tương thích với người của VL 11E1*

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên

kết được chọn các trình tự của gen dòng tế bào mầm IGKV3D-7\*01 và IGKJ4\*02 và cả các CDR của VL 11E1 chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào mầm này.

Như được mô tả trên Fig.40, các gốc in đậm trong trình tự VL 11E1 tương ứng với 30 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 11E1 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGKV3D-7\*01 và IGKJ4\*02).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, 4 trong số 30 các gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. 4 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người là L4 chuột thành M người, Y40 thành S, Y87 thành F và T96 thành P. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.40 dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 11E1 HZVL, trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 24 (S/R), 53 (W/L), 66 (I/T), 67 (L/R), 86 (S/D), 95 (Q/E), 99 (A/F) hoặc 121 (E/D) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác, toàn bộ 18 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 30 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.40 thể hiện VL 11E1 được làm tương thích với người được thực hiện với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

## II - Làm miền thay đổi của chuỗi nặng tương thích với người

*So sánh trình tự nucleotit của VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm chuột*

Để làm bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VH 11E1 được so sánh với phân trình tự với gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Các gen dòng tế bào mầm IGHV1-7\*01, IGHD4-1\*01 và IGHJ3\*01 chuột

có độ giống về trình tự lần lượt là 94,10% đối với vùng V, 66,67% đối với vùng D và 100% đối với vùng J được xác định. Về độ đồng nhất thu được, các tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng trực tiếp trình tự VH 11E1 để xác định mức độ giống người.

Việc sắp thẳng hàng này được thể hiện trên Fig.41A đối với gen V, Fig.41B đối với gen D và Fig.41C đối với gen J.

*So sánh trình tự nucleotit của VH 11E1 với gen dòng tế bào mầm của người*

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với VH 11E1 được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của VH 11E1 được sắp thẳng hàng với gen dòng tế bào mầm của người phân trình tự của dữ liệu IMGT. Để tối ưu hoá việc chọn lọc, việc sắp thẳng hàng giữa các trình tự protein được tiến hành để nghiên cứu độ tương đồng cao hơn.

Hai phương pháp bổ sung này dùng để nhận biết hai trình tự V người nhận có thể đối với CDR VH 11E1 chuột. Việc sắp thẳng hàng nucleotit tạo ra IGHV1-2\*02 gen dòng tế bào mầm người có độ giống về trình tự là 75,69% trong khi việc sắp thẳng hàng protein tạo ra gen dòng tế bào mầm IGHV1-46\*01 người có độ giống về trình tự là 71,10%.

Cần chú ý rằng vùng D hoàn toàn thuộc về vùng CDR3 trong miền VH. Quy trình làm tương thích với người là dựa vào phương pháp “ghép CDR”. Việc phân tích các gen D gần nhất với người là không được sử dụng trong phương pháp này.

Để xác định độ tương đồng đối với vùng J dùng để nhận biết gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*03 người có độ giống về trình tự là 80,85%.

Do vậy, nhìn vào độ tương đồng chung và sắp thẳng hàng các trình tự, gen dòng tế bào mầm IGHV1-46\*01 V người và gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*03 J người được chọn làm trình tự người nhận đối với CDR VH 11E1 chuột.

Việc sắp thẳng hàng được thể hiện trên Fig.42A đối với vùng V và Fig.42B đối với vùng J.

*Phiên bản được làm tương thích với người của VH 11E1*

Các bước sau trong quy trình làm tương thích với người bao gồm việc liên kết được chọn các trình tự của gen dòng tế bào mầm IGHV1-46\*01 và IGHJ4\*03 và cả các CDR VH 11E1 chuột với các khung của các trình tự của gen dòng tế bào

mầm này.

Như được mô tả trên Fig.43, các gốc in đậm trong VH 11E1 trình tự tương ứng với 26 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VH 11E1 và các khung người được chọn (FR người, tức là IGHV1-46\*01 và IGHJ4\*03).

Về một số tiêu chuẩn như sự tham dự đã biết của chúng vào bề mặt chung VH/VL, gắn kết kháng nguyên hoặc cấu trúc CDR, các thay đổi nhóm axit amin giữa các gốc chuột và người, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của miền thay đổi, năm trong số 26 gốc khác nhau được xác định là cuối cùng bị đột biến. 5 gốc được xác định là quan trọng nhất này và các đột biến thành các phần tương ứng của chúng ở người là N40 chuột thành H người, Y55 thành I, D66 thành S, A80 thành R và K82 thành T. Các gốc có thứ hạng 1 này được thể hiện trên Fig.43 dưới dạng các gốc in đậm trong trình tự 11E1 HZVH, trong đó chúng vẫn là chuột.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên.

Với sự trợ giúp của mô hình phân tử, các đột biến khác có thể được xác định. Có thể kể đến các gốc có thứ hạng 2 sau, tức là các gốc 53 (I/M), 71 (L/F), 76 (A/V), 78 (L/M) và 87 (A/V) trên đó các đột biến cũng có thể được dự tính trong phương án được ưu tiên khác.

Tất nhiên, các gốc nêu trên để cuối cùng được thử nghiệm là không bị giới hạn, nhưng phải được coi là các đột biến ưu tiên. Theo phương án được ưu tiên khác, toàn bộ 16 gốc có thứ hạng 3 còn lại trong số 26 axit amin khác nhau có thể được xem xét lại.

Toàn bộ các đột biến nêu trên sẽ được thử nghiệm riêng biệt hoặc theo các cách kết hợp khác nhau.

Fig.43 thể hiện VH 11E1 được làm tương thích với người được thực hiện với các đột biến nêu trên đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Ví dụ 18: Tác dụng của Mab đã được tinh chế đến quá trình phosphoryl hóa c-Met

Trong ví dụ 3, mức độ ảnh hưởng của Mab kháng c-Met đến quá trình phosphoryl hóa được đánh giá bằng dịch nổi bề mặt được định liều từ mỗi tế bào lai cần được đánh giá. Thử nghiệm lại được tiến hành với Mab 11E1 và 224G11 đã được tinh chế được đánh giá ở nồng độ cuối bằng 30 µg/ml (200 nM) hoặc ở

liều lượng nằm trong khoảng từ 0,0015 đến 30 mg/ml (0,01-200 nM) để xác định  $IC_{50}$  của mỗi kháng thể. Quy trình được sử dụng là giống với quy trình được mô tả trong Ví dụ 3.

Các kết quả của 3 thử nghiệm độc lập được thể hiện trên Fig.44 và đã chứng tỏ rằng sau khi được tinh chế, 11E1 và 224G11 không có tác dụng chủ vận khi được bổ sung một mình vào các tế bào A549 và lần lượt có tác dụng đối kháng là 87 và 75% với sự có mặt của HGF. Như mong đợi, Mab 5D5 được đưa vào dưới dạng đối chứng dương chủ vận đã cho thấy tác dụng chủ vận đáng kể (58%) khi được bổ sung một mình và chỉ có tác dụng đối kháng ở mức trung bình (39%) với sự có mặt của HGF. Về tính toán  $EC_{50}$ , cả 11E1 và 224G11 đều có giá trị  $IC_{50}$  ở mức nanomol.

Ví dụ 19: Phối hợp *in vivo* 224G11 và Navelbine<sup>®</sup> trên mô hình dị ghép NCI-H441

Các tế bào NCI-H441 thu được từ ATCC được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI 1640, 10% FCS, 1% L-Glutamin. Các tế bào được phân chia hai ngày trước khi cấy là đang trong giai đoạn phát triển theo hàm số mũ. Mười triệu tế bào NCI-H441 được cấy vào chuột nhắt không có tuyến ức trụi lông. năm ngày sau khi cấy dưới da, khối u là có thể đo được và các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có khối u với kích thước ngang nhau. Các con này được tiêm trong màng bụng với liều 2 mg Mab 224G11/con và sau đó hai lần một tuần với 1 mg kháng thể/con đến ngày 38 hoặc với 3 lần tiêm Navelbine<sup>®</sup> (D5, D12, D19) với liều lượng 8 mg/kg. Nhóm thứ ba được cho điều trị phối hợp cũng được bao gồm. Navelbine<sup>®</sup> được cho dùng bằng cách tiêm trong màng bụng (i.p.). Thể tích khối u được đo hai lần một tuần và được tính toán bằng công thức:  $p/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$  và trọng lượng của con vật được kiểm tra mỗi ngày trong quá trình điều trị bằng Navelbine<sup>®</sup>. Việc phân tích thống kê được tiến hành vào mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm t-test hoặc Mann-Whitney. Trong thử nghiệm này, thể tích khối u trung bình của các nhóm được điều trị theo phương thức đơn lẻ được giảm lần lượt là 72%, 76% và 99,8% đối với 224G11, Navelbine<sup>®</sup> và Navelbine<sup>®</sup> + 224G11 vào ngày 41 sau lần tiêm thứ nhất. Vào ngày 41, việc điều trị phối hợp đã cải thiện một cách đáng kể sự phát triển của khối u so sánh với việc điều trị một mình ( $p \leq 0,041$  so với

Navelbine® một mình và  $p \leq 0,002$  so với 224G11 một mình vào ngày 41), 4 trong số 6 con là không có khối u trong nhóm điều trị phối hợp. Các kết quả được thể hiện trên Fig.45.

Những kết quả này được khẳng định sau khi kết thúc việc điều trị 50 ngày (D88), trong đó 66% con được điều trị phối hợp vẫn không có khối u.

Ví dụ 20: Kết hợp 224G11 và doxorubixin *in vivo* trên mô hình dị ghép NCI-H441

Các tế bào NCI-H441 thu được từ ATCC được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI 1640, 10% FCS, 1% L-Glutamin. Các tế bào được phân chia hai ngày trước khi cấy là đang trong giai đoạn phát triển theo hàm số mũ. Mười triệu tế bào NCI-H441 được cấy vào chuột nhắt không có tuyến ức trụi lông. Năm ngày sau khi cấy dưới da, khối u là có thể đo được và các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có khối u với kích thước ngang nhau. Các con này được tiêm trong màng bụng với liều 2 mg Mab 224G11/con và sau đó hai lần một tuần với 1 mg kháng thể/con hoặc với 4 lần tiêm doxorubixin (D5, D12, D19, D26) ở liều lượng 5 mg/kg. Nhóm thứ ba được cho điều trị phối hợp cũng được bao gồm. Doxorubixin được cho dùng bằng cách tiêm qua đường tĩnh mạch (i.v.). Thể tích khối u được đo hai lần một tuần và được tính toán bằng công thức:  $p/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$  và trọng lượng của con vật được kiểm tra mỗi ngày trong thời gian điều trị bằng doxorubixin. Việc phân tích thống kê được tiến hành vào mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm t-test hoặc Mann-Whitney. Cả hai phương pháp điều trị riêng lẻ và điều trị phối hợp đều thể hiện hoạt tính kháng khối u đáng kể so với nhóm đối chứng ( $p \leq 0,002$  từ D11 đến D39). Các kết quả được thể hiện trên Fig.46.

Việc điều trị phối hợp cũng đã thể hiện hoạt tính sinh trưởng kháng u đáng kể so với điều trị theo phương thức đơn lẻ từ D11 đến D39 đã chỉ ra rằng có lợi ích khi điều trị phối hợp doxorubixin với kháng c-Met.

Ví dụ 21: Phối hợp 224G11 và doxetaxel *in vivo* trên mô hình dị ghép NCI-H441

Các tế bào NCI-H441 thu được từ ATCC được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI 1640, 10% FCS, 1% L-Glutamin. Các tế bào được phân chia hai ngày trước khi cấy là đang trong giai đoạn phát triển theo hàm số mũ. 9 triệu tế bào

NCI-H441 được cấy vào chuột nhắt không có tuyến ức trụi lông. 5 ngày sau khi cấy dưới da, khối u là có thể đo được và các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có khối u với kích thước ngang nhau. Các con này được tiêm trong màng bụng với liều 2 mg Mab 224G11/con và sau đó hai lần một tuần với 1 mg kháng thể/con hoặc với 4 lần tiêm doxorubicin (D5, D12, D19, D26) với liều lượng 7,5 mg/kg. Nhóm thứ ba được cho điều trị phối hợp cũng được bao gồm. Doxorubicin được cho dùng bằng cách tiêm trong màng bụng (i.p.). Thể tích khối u được đo hai lần một tuần và được tính toán bằng công thức:  $p/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$  và trọng lượng của con vật được kiểm tra mỗi ngày trong thời gian điều trị bằng doxorubicin. Việc phân tích thống kê được tiến hành vào mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm t-test hoặc Mann-Whitney. Cả hai phương pháp điều trị đơn lẻ và kết hợp đều đã thể hiện hoạt tính kháng khối u đáng kể so với nhóm đối chứng ( $p \leq 0,002$  từ D11 đến D35). Các kết quả được thể hiện trên Fig.47.

Việc điều trị phối hợp cũng đã được chứng minh hoạt tính sinh trưởng kháng khối u đáng kể so với điều trị theo phương thức đơn lẻ từ D18 đến D35 đã chỉ ra rằng có ưu điểm khi điều trị phối hợp doxorubicin với kháng c-Met.

Ví dụ 22: Kết hợp 224G11 và Temozolomit *in vivo* trên mô hình dị ghép U87MG

Các tế bào U87-MG thu được từ ATCC được nuôi cấy thông thường trong môi trường DMEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin. Các tế bào được phân chia hai ngày trước khi cấy là đang trong giai đoạn phát triển theo hàm số mũ. 5 triệu tế bào U87-MG được cấy vào chuột nhắt không có tuyến ức trụi lông. 19 ngày sau khi cấy dưới da, khối u là có thể đo được và các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có khối u với kích thước ngang nhau. Các con này được tiêm trong màng bụng với liều 2 mg Mab 224G11/con và sau đó hai lần một tuần với 1 mg kháng thể/con hoặc với 3 lần tiêm Temozolomit (D19, D26, D33) với liều lượng 5 mg/kg. Nhóm thứ ba được cho điều trị phối hợp cũng được bao gồm. Temozolomit được cho dùng bằng cách tiêm trong màng bụng (i.p.). Thể tích khối u được đo hai lần một tuần và được tính toán bằng công thức:  $p/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$  và trọng lượng của con vật được kiểm tra mỗi ngày trong thời gian Temozolomit điều trị. Việc phân tích thống kê được tiến hành vào mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm t-test hoặc Mann-Whitney. Cả hai phương pháp điều trị đơn lẻ và phối hợp đều đã thể hiện hoạt tính kháng

khối u đáng kể so với nhóm đối chứng ( $p \leq 0,002$  từ D22 đến D32 (trong đó chuột nhắt đối chứng được làm chết êm ái vì lý do đạo đức)). Các kết quả được thể hiện trên Fig.48.

Việc điều trị phối hợp cũng đã cho thấy hoạt tính sinh trưởng kháng khối u đáng kể so với điều trị theo phương thức đơn lẻ ( $P \leq 0,002$  từ ngày 22 đến ngày 43 (trong đó chuột nhắt đối chứng được làm chết êm ái vì lý do đạo đức) đối với Temozolomit và từ ngày 29 đến ngày 53 (ngày cuối của quá trình điều trị) đối với 224G11. Các dữ liệu này đã chỉ ra rằng có ưu điểm khi điều trị kết hợp Temozolomit với kháng c-Met.

#### Ví dụ 23: Sự tạo thành khối phỏng cầu

Như đã được mô tả trong Ví dụ 9 đối với các Mab khác, chúng ta đánh giá khả năng của Mab 224G11 ức chế sự phát triển in vitro của khối u trong mô hình khối phỏng cầu U87-MG. Nhằm mục đích đó, các tế bào U87-MG được sinh trưởng dưới dạng lớp đơn được tách ra bằng trypsin-EDTA và được tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào đầy đủ. Các khối phỏng cầu được bắt đầu bằng cách đưa 625 tế bào vào từng lỗ của các đĩa có 96 lỗ đáy tròn, trong DMEM-2,5% FCS. Để ngăn không cho tế bào bám dính vào đáy, các đĩa được phủ trước bằng polyHEMA trong 95% etanol và không khí được làm khô ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được ủ trong các điều kiện dịch nuôi cấy tế bào chuẩn ở nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong tủ áp được điều ẩm. Các kháng thể đơn dòng đã được tinh chế (10 µg/ml) được bổ sung sau từ 4 đến 10 ngày sau khi nuôi cấy khối phỏng cầu. Các khối phỏng cầu được giữ trong môi trường nuôi cấy trong thời gian ít nhất 17 ngày. Sau đó, sự phát triển khối phỏng cầu được kiểm tra bằng cách đo diện tích khối phỏng cầu bằng cách sử dụng buồng tự đo cài phần mềm AxioVision. Diện tích được biểu thị bằng µm<sup>2</sup>. 8-16 khối phỏng cầu được đánh giá đối với mỗi điều kiện. Kích thước khối phỏng cầu được đo trước khi bổ sung các kháng thể, sau 10 ngày nuôi cấy và sau 17 ngày nuôi cấy.

Trong các điều kiện này, thu được các khối phỏng cầu đồng nhất và không quan sát thấy có sự sai khác thống kê nào trước khi bổ sung các kháng thể (Fig.49A).

Như được minh họa trên các Fig.49B-49D, đối chứng isotyp, 9G4 không tác động đến sự phát triển của khối phỏng cầu sau 10 hoặc 17 ngày nuôi cấy. Trong khi việc bổ sung 5D5 đã không có ảnh hưởng lớn đến kích thước khối



phòng cầu, thì việc bổ sung 224G11 và 11E1 đã ức chế rõ rệt sự phát triển của khối u.

Ví dụ 24: Hoạt tính *in vitro* của các dạng kháng và được làm tương thích với người của 224G11 trong thử nghiệm phospho-c-Met

Để so sánh hiệu quả *in vitro* của các dạng chuột, kháng và được làm tương thích với người trong thử nghiệm chức năng, dịch nổi bề mặt nuôi cấy thu được từ tế bào lai 224G11, và các tế bào được chuyển nhiễm HEK293 được xử lý và được thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3. Dữ liệu được tóm tắt trên Fig.50 đã cho thấy các kết quả mong đợi đối với kháng thể chuột không được tinh chế như đã được mô tả trên Fig.6B. Cả các kháng thể không được tinh chế kháng và được làm tương thích với người đều biểu hiện hoạt tính có thể so sánh được khi được bổ sung một mình (Fig.50A) hoặc khi được ủ với sự có mặt của HGF (Fig.50B).

Ví dụ 25: Xác định các hằng số ái lực (KD) của các kháng thể kháng c-Met bằng phân tích Biacore

Ái lực gắn kết của các kháng thể 11E1 và 224G11 đã được tinh chế được nghiên cứu bằng cách BIAcore X sử dụng miền ngoại bào (ECD) c-Met tái tổ hợp được dung hợp với miền Fc IgG1 người (R&D Systems) làm kháng nguyên (MW = 129 kDa). Khi cả hai protein dung hợp c-Met-Fc và các kháng thể đều là các hợp chất có hoá trị hai, các đoạn Fab của mAb 11E1 và 224G11 (MW = 50 kDa) được tạo ra bằng cách phân giải, được tinh chế và sử dụng trong thử nghiệm này, để tránh nhiễu với thông số ái lực. Đối với thử nghiệm này, kháng thể bắt giữ histidin kháng Tag được phủ lên chip cảm biến CM5. Dung dịch đệm chạy là HBS-EP, tốc độ chảy là 30 µl/phút và thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 25°C. Kháng nguyên c-Met (ECD\_M1)2-Fc-(HHHHHH)2 tan bị hút vào chip cảm biến (khoảng 270 RU), và các kháng thể để thử nghiệm được sử dụng trong dung dịch như là chất phân tích. Chip cảm biến được tái sinh bằng cách sử dụng Glyxin, dung dịch đệm HCl có độ pH=1,5 lên cả hai flowcell trong nửa phút.

Fig.51 minh họa nguyên lý của phân tích này. Các thông số động học thu được được tóm tắt trong bảng 4 dưới đây. Các thông số này đã chỉ ra rằng cả các kháng thể kháng c-Met 11E1 và 224G11 đều gắn kết protein dung hợp c-Met-Fc tái tổ hợp với ái lực có thể so sánh được vào khoảng 40 pM.

**Bảng 4**

|                   | $K_{on1}$<br>$\times 10^{-6}$<br>[1/M.s] | $K_{on1}$<br>$\times 10^{-6}$<br>[1/M.s] | Thời gian bán tồn<br>[h] | K<br>[pM]      |
|-------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|----------------|
| <b>Fab 11E1</b>   | $1,13 \pm 0,01$                          | $4,68 \pm 0,001$                         | 4,1                      | $41,4 \pm 0,5$ |
| <b>Fab 224G11</b> | $2,04 \pm 0,01$                          | $7,79 \pm 0,40$                          | 2,5                      | $34,8 \pm 1,9$ |

Ví dụ 26: Hoạt tính *in vivo* của 224G11 đến các tế bào MDA-MB-231 cùng được cấy bằng các tế bào MRC5 như là nguồn HGF người lên chuột nhắt không có tuyến ức trụi lông

Các tế bào MDA-MB-213 và MRC5 thu được từ ATCC cả hai đều được nuôi cấy trong môi trường DMEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin. Các tế bào được phân chia hai ngày trước khi cấy là đang trong giai đoạn phát triển theo hàm số mũ. 5 triệu tế bào MDA-MB-231 và 500 000 tế bào MRC5 cùng được tiêm vào da (s.c.) của chuột nhắt không có tuyến ức trụi lông. 12 ngày sau khi cấy dưới da, khối u là có thể đo được và các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con có khối u với kích thước ngang nhau. Các con này được tiêm trong màng bụng với liều 2 mg Mab 224G11/con và sau đó hai lần một tuần với 1 mg kháng thể/con. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần và được tính toán bằng công thức:  $p/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$ .

Các kết quả được mô tả trên Fig.52 đã cho thấy sự khác biệt đáng kể về sự phát triển khối u trung bình của chuột nhắt được điều trị bằng 224G11 so với sự phát triển khối u trung bình của nhóm đối chứng.

Ví dụ 27: Các nguyên tố bổ sung cho quá trình làm tương thích với người của các kháng thể 227H1, 11E1 và 224G11

#### *Quy trình chung*

Việc làm tương thích với người của các kháng thể kháng cMet được tiến thành độc lập đối với mỗi chuỗi và một cách liên tục, đối với axit amin được phân tích trong mỗi miền thay đổi. Quy trình làm tương thích với người được đánh giá

trong bước đầu tiên trong thử nghiệm gắn kết trên cơ sở ELISA với Fc-cMet tái tổ hợp; hoạt tính gắn kết, các kháng thể người được làm tương thích với được so sánh với kháng thể khảm tái tổ hợp. Trong bước thứ hai, các kháng thể được làm tương thích với người kháng cMet được đánh giá về khả năng của chúng trong việc thay thế gắn kết Fc-cMet trên HGF tái tổ hợp được bao bằng chất dẻo; thử nghiệm cạnh tranh này cho phép so sánh trực tiếp các phiên bản chuột, khảm và được làm tương thích với người của các kháng thể kháng cMet.

Fig.53 và Fig.54 đã minh họa hoạt tính gắn kết kháng cMet điển hình của các kháng thể đơn dòng của chuột 227H1, 11E1 và 224G11.

Fig.53 thể hiện hoạt tính gắn kết trực tiếp kháng cMet của các kháng thể chuột đã được tinh chế được phát hiện. Trong thử nghiệm này, các kháng thể kháng cMet đơn dòng của chuột biểu hiện hoạt tính gắn kết kháng cMet khác nhau nhưng vẫn phụ thuộc liều lượng.

Fig.54 thể hiện hoạt tính cạnh tranh gắn kết HGF-cMet của các kháng thể chuột đã được tinh chế. Thử nghiệm cạnh tranh biểu lộ sự khác biệt đáng tin cậy giữa các kháng thể đơn dòng kháng cMet này với hoạt tính cạnh tranh ở mức trung bình, không hoàn toàn nhưng đáng tin cậy đối với kháng thể đơn dòng 11E1 trong khi 224G11 và 227H1 của chuột biểu hiện hoạt tính cạnh tranh tương tự với sự thay thế gắn kết HGF tối đa 100% ở nồng độ kháng thể cao. Kháng thể đơn dòng 224G11 đã thể hiện giá trị  $IC_{50}$  tốt nhất.

Cần chú ý rằng hoạt tính gắn kết trực tiếp của các kháng thể chuột không phản ánh đặc tính cạnh tranh gắn kết HGF nội tại của chúng.

Hai thử nghiệm này được sử dụng để xác định đặc điểm các phiên bản khảm tái tổ hợp và được làm tương thích với người của các kháng thể kháng cMet chuột. Nhằm mục đích này, vắn tắt, miễn thay đổi kháng cMet, hoặc là chuột hoặc được làm tương thích với người, được tạo dòng vô tính trong một loạt vật truyền biểu hiện LONZA's pCONplus và các kháng thể thu được từ IgG<sub>1</sub>/κ tái tổ hợp được biểu hiện trong các tế bào CHO. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy biểu hiện được cô và được thẩm tách kỹ đối với PBS và sau đó được dùng đối với các nồng độ của các kháng thể được biểu hiện và được sử dụng trực tiếp để đánh giá hoạt tính gắn kết kháng cMet tương ứng. Cả hai thử nghiệm gắn kết trực tiếp và cạnh tranh HGF đều được đánh giá để xác định đặc điểm các phiên bản khảm tái tổ hợp hoặc được làm tương thích với người.

Ví dụ 27-1: Làm miễn thay đổi của chuỗi nặng 227H1 tương thích với người

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với trình tự chuỗi VH 227H1 được nghiên cứu. Với sự trợ giúp của dữ liệu IMGT, gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 V người và gen dòng tế bào mầmIGHJ4\*01 J người được chọn làm trình tự người nhận đối với CDRVH 227H1 của chuỗi.

Fig.55 thể hiện việc sắp thẳng hàng axit amin của miền VH 227H1 của chuỗi với khung người được chọn. Trên vạch FR người, chỉ thể hiện axit amin được thấy là khác với miền VH của chuỗi 227H1. Các vạch HZ3VH, HZ2VH và HZ1VH tương ứng với các phiên bản được làm tương thích với người được thực hiện của miềnVH 227H1 với các đột biến nêu trên (vạch “changed in”) đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Trong loạt thử nghiệm đầu tiên, các tác giả sáng chế đã xây dựng và phân tích hoạt tính gắn kết kháng cMet của ba phiên bản được làm tương thích với người đầu tiên của miền VH của chuỗi 227H1 khi được biểu hiện kết hợp với chuỗi nhẹ khảm 227H1. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet được thể hiện trên Fig.56. Trong thử nghiệm này, không quan sát thấy có sự khác biệt nào về khả năng gắn kết của các kháng thể khảm tái tổ hợp hoặc được làm tương thích với người một phần thu được từ 227H1 được thử nghiệm. Ở điểm này, 26 trong số 32 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VH 227H1 của chuỗi và khung người được chọn đã được phân tích và thấy là không liên quan đối với hoạt tính gắn kết kháng cMet của miền VH được làm tương thích với người 227H1, khi kết hợp với chuỗi nhẹ khảm.

Kết hợp với phân tích sinh đột biến được định hướng vị trí của 6 góc chuỗi cuối cùng trong phiên bản được làm tương thích với người HZ1VH của miền VH 227H1, các tác giả sáng chế đã xây dựng phiên bản “được làm tương thích với người IMGT hoàn toàn” HZ4VH gốc và đã thử nghiệm đặc tính gắn kết kháng cMet của nó. Các kết quả được đưa ra trên Fig.57 đối với thử nghiệm gắn kết trực tiếp và trên Fig.58 đối với thử nghiệm cạnh tranh gắn kết HGF. Cần chú ý rằng cả hai phiên bản 227H1 khảm tái tổ hợp và được làm tương thích với người đều biểu hiện hoạt tính cạnh tranh tốt hơn so với kháng thể chuỗi bố mẹ.

Tuy nhiên, dựa vào dữ liệu thử nghiệm thu được đối với đặc tính gắn kết kháng cMet của miền VH 227H1 được làm tương thích với người “IMGT hoàn

toàn”, trình tự axit amin thu được được mô tả trên Fig.59 được chọn và phân tích thông tin sinh học sau đó được tiến thành để đánh giá mức độ “giống người” của miền thay đổi được làm tương thích với người. 227H1-HZ VH.

Nhằm mục đích này, việc so sánh đơn giản các trình tự khung với dữ liệu người được tiến thành bằng cách sử dụng công cụ IMGT. Dựa vào mức độ làm tương thích với người mà đạt được trong quy trình này, trong số 89 axit amin được phân tích tương ứng với các gốc khung, 89 được thấy là đáng tin cậy có nguồn gốc người. Chỉ các gốc từ CDR có thể được thấy là khác nhau, nhưng nếu vậy, có sự khác biệt với gen dòng tế bào mầm người tương ứng, và rõ ràng là ở các vị trí siêu biến. Dựa trên cơ sở hệ thống đánh số IMGT và các công cụ phân tích độ tương đồng, các tác giả sáng chế lần đầu tiên đã làm cho miền thay đổi kháng thể có nguồn gốc từ chuột tương thích với người một cách hoàn toàn.

Ví dụ 27-2: Làm kháng thể đơn dòng 11E1 tương thích với người

I - Làm miền thay đổi của chuỗi nặng 11E1 tương thích với người

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với trình tự chuỗi VH 11E1 được nghiên cứu. Với sự trợ giúp của dữ liệu IMGT, gen dòng tế bào mầm IGHV1-46\*01 V người và gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*03 J người được chọn làm trình tự người nhận đối với CDR VH 11E1 chuỗi.

Fig.60 thể hiện việc sắp thẳng hàng axit amin của miền VH 11E1 chuỗi với khung người được chọn. Trên vạch FR người, chỉ thể hiện axit amin được thấy là khác với miền VH của chuỗi 11E1. Các vạch HZ VH3, HZ VH2 và HZ VH1 tương ứng với các phiên bản được làm tương thích với người được thực hiện của miền VH 11E1 với các đột biến nêu trên (vạch “changed in”) đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Trong loạt thử nghiệm đầu tiên, các tác giả sáng chế đã xây dựng và phân tích hoạt tính gắn kết kháng cMet của ba phiên bản được làm tương thích với người đầu tiên của miền VH của chuỗi 11E1 khi được biểu hiện kết hợp với chuỗi nhẹ khảm 11E1. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet được thể hiện trên Fig.61. Trong thử nghiệm này, không quan sát thấy có sự khác biệt nào về khả năng gắn kết của các kháng thể khảm tái tổ hợp hoặc được làm tương thích với người một phần thu được từ 11E1 được thử nghiệm. Ở điểm

này, 19 trong số 24 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VH 11E1 chuột và khung người được chọn đã được phân tích và thấy là không liên quan đối với hoạt tính gắn kết kháng cMet của miền VH được làm tương thích với người 11E1, khi kết hợp với chuỗi nhẹ khảm.

## II - Làm miền thay đổi của chuỗi nhẹ 11E1 tương thích với người

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với trình tự VL 11E1 chuột được nghiên cứu. Với sự trợ giúp của dữ liệu IMGT, gen dòng tế bào mầm IGKV3D-7\*01 V người và gen dòng tế bào mầm IGKJ4\*01 J người được chọn làm trình tự người nhận đối với CDR VL 11E1 chuột.

Fig.55 thể hiện việc sắp thẳng hàng axit amin của miền VL 11E1 chuột với khung người được chọn. Trên vạch FR người, chỉ thể hiện axit amin được thấy là khác với miền VL chuột 11E1. Các vạch HZ VL3, HZ VL2 và HZ VL1 tương ứng với các phiên bản được làm tương thích với người được thực hiện của miền VL 11E1 với các đột biến nêu trên (vạch “changed in”) đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành.

Trong loạt thử nghiệm đầu tiên, các tác giả sáng chế đã xây dựng và phân tích hoạt tính gắn kết kháng cMet của ba phiên bản được làm tương thích với người đầu tiên của miền VL chuột 11E1 khi được biểu hiện kết hợp với chuỗi nặng khảm 11E1. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet được thể hiện trên Fig.63. Trong thử nghiệm này, không quan sát thấy có sự khác biệt nào về khả năng gắn kết của các kháng thể khảm tái tổ hợp hoặc được làm tương thích với người một phần thu được từ 11E1 được thử nghiệm. Ở điểm này, 26 trong số 30 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 11E1 chuột và khung người được chọn đã được phân tích và thấy là không liên quan đối với hoạt tính gắn kết kháng cMet của miền VL được làm tương thích với người 11E1, khi kết hợp với chuỗi nặng khảm.

## III - Làm kháng thể 11E1 tương thích với người

Ở giai đoạn này của quy trình làm kháng thể đơn dòng 11E1 tương thích với người, trình tự kháng thể được làm tương thích với người thu được theo lý thuyết chỉ chứa 5 gốc CDR bên ngoài có nguồn gốc từ miền VH của chuột bố mẹ và 4 gốc CDR bên ngoài có nguồn gốc từ trình tự VL chuột bố mẹ (xem Fig.60, đường HZ VH1 và Fig.62, đường HZ VL1). Sau đó, các tác giả sáng chế đã quyết

định xác định đặc điểm ngay phiên bản được làm tương thích với người chuỗi nặng và nhẹ kết hợp thu được của kháng thể 11E1. Các kết quả được đưa ra trên Fig.64 đối với thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet.

Trong thử nghiệm này, đã quan sát thấy khả năng gắn kết tương tự đối với các kháng thể tái tổ hợp khảm hoặc được làm tương thích với người thu được từ 11E1 được thử nghiệm. Phân tích đặc tính cạnh tranh gắn kết HGF và phân tích sinh đột biến được định hướng vị trí của 9 gốc chuột bên trái còn lại để được tiến thành một cách độc lập hoặc kết hợp trong phiên bản “được làm tương thích với người sơ bộ” VH1/VL1 được chọn của kháng thể đơn dòng 11E1.

Ví dụ 27-3: Làm kháng thể đơn dòng 224G11 tương thích với người

I - Làm miễn thay đổi của chuỗi nặng 224G11 tương thích với người

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với trình tự chuột VH 224G11 được nghiên cứu.

Về mức độ tương đồng trình tự cao giữa các trình tự miền VH 224G11 và 227H1, và như được xác nhận bằng việc sử dụng các công cụ dữ liệu IMGT, cùng một gen dòng tế bào mầm IGHV1-2\*02 V người và gen dòng tế bào mầm IGHJ4\*01 J người được chọn làm trình tự người nhận đối với các CDR VH 224G11 của chuột.

Dựa vào mức độ tương đồng cao này, các tác giả sáng chế đã quyết định chuyển một cách trực tiếp thông tin tương thích với người có được từ quá trình làm miễn VH 227H1 tương thích với người (xem ví dụ 27) và sau đó các tác giả sáng chế đã thiết kế phiên bản được làm tương thích với người “IMGT hoàn toàn” như được mô tả trên Fig.65 thể hiện việc sắp thẳng hàng axit amin của các miền VH 227H1 và 224G11 của chuột với khung người được chọn. Trên đường FR người, chỉ thể hiện axit amin được thấy là khác với miền VH của chuột 224G11. Đường HZVH0 tương ứng với phiên bản được làm tương thích với người “IMGT hoàn toàn” của miền VH 224G11 như thu được đối với miền 227H1-HZVH “IMGT hoàn toàn”.

Phiên bản được làm tương thích với người “IMGT hoàn toàn” của miền VH của chuột 224G11 sau đó được xây dựng và hoạt tính gắn kết kháng cMet của nó được phân tích, khi được biểu hiện kết hợp với khảm chuỗi nhẹ 224G11. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet được thể hiện trên

Fig.66, trong khi Fig.67 minh họa thử nghiệm cạnh tranh gắn kết HGF. Dựa vào dữ liệu thử nghiệm thu được về đặc tính gắn kết kháng cMet của miền VH 224G11 được làm tương thích với người “IMGT hoàn toàn”, các trình tự axit amin thu được như được mô tả trên Fig.65 được chọn và sau đó phân tích thông tin sinh học được tiến hành để đánh giá mức “tương thích với người” của miền 224G11-HZ VH0.

Dựa vào phương pháp làm tương thích với người được áp dụng ở đây, tham khảo ví dụ 27 về phân tích tính người của trình tự 224G11 HZ VH0. Như được mô tả đối với việc làm miền VH 227H1 tương thích với người, các tác giả sáng chế đã khẳng định độ tin cậy của hệ thống đánh số IMGT và các công cụ phân tích độ tương đồng, và cũng đã chứng minh khả năng chuyển phương pháp làm tương thích với người giữa các kháng thể trong giới hạn độ tương đồng nội tại của chúng.

## II - Làm miền thay đổi của chuỗi nhẹ 224G11 tương thích với người

Để xác định người tham dự tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm của người biểu hiện độ đồng nhất cao nhất với trình tự chuỗi VL 224G11 được nghiên cứu. Với sự trợ giúp của công cụ phân tích dữ liệu IMGT, hai vùng V người nhận có thể đối với các CDR VL 224G11 của chuỗi được xác định. Do vậy, hai phương pháp làm tương thích với người được hoạch định đối với miền VL 224G11. Phương pháp thứ nhất tương ứng với thử nghiệm ban đầu đối với khung người có chiều dài ngắn hơn CDR1 (IGKV3-11\*01), phương pháp thứ hai có chiều dài CDR1 dài hơn (IGKV4-1\*01).

Fig.68 thể hiện việc sắp thẳng hàng axit amin của miền VL 224G11 của chuỗi với hai khung người được chọn. Trong cả hai vạch Hu-FR FR ngắn hơn và dài hơn, chỉ thể hiện axit amin được thấy là khác với miền VL 224G11 của chuỗi. Các vạch HZ VL3 và HZ VL6 tương ứng với phiên bản được làm tương thích với người cơ bản của miền VL 224G11 với các đột biến nêu trên (đường “thứ hạng”) đã được xác định một cách rõ ràng. Số cho mỗi đột biến đề xuất tương ứng với thứ hạng mà tại đó đột biến nêu trên sẽ được tiến hành bất cứ khi nào khung CDR1 cơ bản “ngắn hơn” hoặc “dài hơn” sẽ được chọn.

Trong bộ thử nghiệm thứ nhất, hai phiên bản được làm tương thích với người cơ bản của miền VL chuỗi 224G11 được xây dựng và hoạt tính gắn kết kháng cMet của chúng được phân tích, khi được biểu hiện kết hợp với chuỗi nặng khảm 224G11. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet



được thể hiện trên Fig.69. Trong thử nghiệm này, hoạt tính gắn kết kháng cMet tương tự được quan sát đối với phiên bản khảm và HZ VL6 (“CDR1 dài hơn”) trong khi hầu như không một gắn kết nào phát hiện được đối với kháng thể thu được từ 224G11 tái tổ hợp HZ VL3 (“CDR1 ngắn hơn”).

Trong bộ thử nghiệm thứ hai, các tác giả sáng chế đã xây dựng và phân tích hoạt tính gắn kết kháng cMet của phiên bản được làm tương thích với người đã được thực hiện của miền VH 224G11 thu được từ HZ VL6 khi được biểu hiện kết hợp với chuỗi nặng khảm 224G11. Hai dạng được làm tương thích với người bổ sung được phân tích; trong phiên bản HZ VL5, 7 gốc từ nhóm thứ ba (thứ hạng 3) được làm tương thích với người và trong phiên bản HZ VL4, 4 gốc bên trái từ nhóm thứ nhất (các gốc thứ hạng 1) chỉ vẫn là chuột. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet được thể hiện trên Fig.70. Trong thử nghiệm này, không có sự khác biệt nào về khả năng gắn kết của các kháng thể tái tổ hợp khảm hoặc được làm tương thích với người một phần thu được từ 224G11 được thử nghiệm được quan sát. Ở điểm này, 18 trong số 22 axit amin được thấy là khác nhau giữa miền VL 224G11 của chuột và khung người “CDR1 dài hơn” được chọn được phân tích và phát hiện thấy không có sự liên quan về hoạt tính gắn kết kháng cMet của miền VL được làm tương thích với người 224G11, khi kết hợp với chuỗi nặng khảm.

Sau đó, đã tiến hành thử nghiệm phiên bản được làm tương thích với người HZ VL4 của miền VL 224G11 trong thử nghiệm cạnh tranh gắn kết HGF. Như được thể hiện trên Fig.71, các kết quả thu được đã chứng minh hoạt tính cạnh tranh tương tự của các kháng thể thu được từ 224G11 của chuột và khảm tái tổ hợp và được làm tương thích với người HZ VL4.

Ở giai đoạn này của quá trình làm miền VL 224G11 tương thích với người, trình tự thu được chỉ chứa 4 gốc CDR bên ngoài có nguồn gốc từ trình tự chuột bố mẹ. Như được thể hiện trên Fig.72, 4 gốc được đánh dấu Đ là L4, M39, H40 và R84.

Dựa trên hệ thống đánh số IMGT và các công cụ phân tích độ tương đồng, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng khung người biểu hiện sự khác biệt về cấu trúc về chiều dài CDR có thể vẫn thích hợp trong quy trình làm tương thích với người. Các tác giả sáng chế đã quyết định xác định đặc điểm phiên bản được làm tương thích với người chuỗi nặng và nhẹ thu được của kháng thể 224G11. Phân tích sinh đột biến định hướng vị trí phần đóng góp của 4 gốc chuột được tiến

thành sau đó khi được biểu hiện kết hợp với phiên bản được làm tương thích với người VH0 của chuỗi nặng.

### III - Làm kháng thể 224G11 tương thích với người

Trong loạt thử nghiệm đầu tiên, các tác giả sáng chế đã xây dựng và phân tích hoạt tính gắn kết kháng cMet của phiên bản được làm tương thích với người hoàn toàn của kháng thể 224G11. Phiên bản tái tổ hợp này bao gồm cả các miền VH và VL được làm tương thích với người lần lượt là VH0 và VL4. Các kết quả thu được từ thử nghiệm gắn kết trực tiếp kháng cMet được thể hiện trên Fig.73. Trong thử nghiệm này, hoạt tính gắn kết kháng cMet 224G11 người hoàn toàn được phát hiện thấy là tương tự với hoạt tính gắn kết của các phiên bản 224G11 tái tổ hợp khảm và được làm tương thích với người “chuỗi đơn”.

Đã thử nghiệm phiên bản được làm tương thích với người một cách hoàn toàn của miền VL 224G11 trong thử nghiệm cạnh tranh gắn kết HGF. Các kết quả thu được như được thể hiện trên Fig.74 đã chứng minh hoạt tính cạnh tranh tương tự của các kháng thể thu được từ 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn khảm tái tổ hợp và chuỗi bỏ mẹ.

Ở giai đoạn này của quá trình làm kháng thể 224G11 tương thích với người, trình tự thu được chỉ chứa 4 gốc CDR bên ngoài có nguồn gốc từ trình tự miền thay đổi của chuỗi nhẹ chuỗi bỏ mẹ. Sau đó, các tác giả sáng chế đã phân tích các biến thể đơn sinh đột biến hướng vị trí của miền VL được làm tương thích với người VL4 khi được biểu hiện kết hợp với phiên bản được làm tương thích với người VH0 của chuỗi nặng. Như được minh họa trên Fig.75 đối với thử nghiệm gắn kết trực tiếp, các tác giả sáng chế đã được xác định các gốc liên quan tiềm năng trong số 4 gốc được thử nghiệm, là M39 và H40.

Các tác giả sáng chế đã quyết định phân tích các thể đa đột biến của miền VL 224G11 được làm tương thích với người HZ VL4 khi được biểu hiện kết hợp với miền VH 224G11 được làm tương thích với người HZ VH0. Như được thể hiện trên Fig.76 đối với thử nghiệm gắn kết trực tiếp và trên Fig.77 đối với thử nghiệm cạnh tranh gắn kết HGF, các thể đa đột biến axit amin của miền VL4 được phân tích để xác định sự kết hợp được làm tương thích với người tốt nhất. Dựa trên phân tích các thể đơn đột biến, các tác giả sáng chế đã tập trung vào các thể đột biến đôi và ba có thể có hoạt tính kháng cMet tốt nhất. Thể đột biến VH0/VL4-2x tương ứng với miền VH được làm tương thích với người HZ VH0 224G11 được biểu hiện với miền VL được làm tương thích với người HZ VL4

224G11 với L4M/R84G đột biến kép. Thử đột biến VH0/VL4-3x tương ứng với miền VH được làm tương thích với người HZ VH0 224G11 được biểu hiện với miền VL được làm tương thích với người HZ VL4 224G11 với ba đột biến L4M/M39L/R84G.

Dựa vào dữ liệu thử nghiệm thu được về đặc tính gắn kết kháng cMet của kháng thể 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn, phân tích thông tin sinh học của cả hai trình tự miền thay đổi của chuỗi nặng và nhẹ sau đó được tiến hành để đánh giá mức “tương thích với người” của các phiên bản được làm tương thích với người tốt nhất VH0/VL4-2x và VH0/VL4-3x. Trước đây đã chứng minh việc làm tương thích với người “IMGT hoàn toàn” của miền VH VH0 224G11. Về mức “tương thích với người” của các phiên bản miền VL được làm tương thích với người VL4-2x và -3x 224G11, chúng chỉ chứa các gốc M39 và/hoặc H40 chuột. Hai gốc chính tiềm năng này nằm ở điểm kết thúc của CDR1, M39 là điểm liên kết CDR đầu tận N. Dựa vào chiều dài CDR, vấn đề mà các tác giả sáng chế đã phải đối mặt trong quá trình làm miền VL 224G11 tương thích với người, và cân nhắc các vị trí đó như một phần của việc xác định VL CDR1 theo Kabat, mức tương thích với người của kháng thể 224G11 được làm tương thích với người một cách hoàn toàn phải biểu hiện tính sinh miễn dịch giảm mạnh do các gốc chuột được bảo toàn tối thiểu.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập được, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này có chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 56, 57 và 58; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 59, 60 và 61.
2. Kháng thể theo điểm 1, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này có chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 62 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 63.
3. Tế bào lai của chuột có khả năng tiết kháng thể theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, tế bào lai này là tế bào lai của chuột được nộp lưu tại Le Centre National de Cinéma du Mali (CNCM), viện Pasteur, Paris, vào ngày 14 tháng Ba, năm 2007 với số I-3724.
4. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này là kháng thể đơn dòng.
5. Kháng thể theo điểm 4, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này là kháng thể khảm, trong đó các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của người.
6. Kháng thể theo điểm 4, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người, trong đó các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của người lần lượt đối với chuỗi nhẹ là vùng kappa và đối với chuỗi nặng là vùng gama-1, gama-2 hoặc gama-4 .

7. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể được làm tương thích với người này có khung của người của miền thay đổi của chuỗi nhẹ được mã hoá bởi gen dòng tế bào mầm IGKV3-7\*01 và IGKJ4\*01 người, trong đó các khung của người này có ít nhất một đột biến từ gốc của người thành gốc của chuột được chọn từ M4 thành L, S40 thành Y, F87 thành Y và P96 thành T.

8. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể được làm tương thích với người này có các khung của miền thay đổi của chuỗi nặng được mã hoá bởi gen dòng tế bào mầm IGHV1-46\*01 và IGHJ4\*03 người, trong đó các khung của người này có ít nhất một đột biến từ gốc của người thành gốc của chuột được chọn từ H40 thành N, I55 thành Y, S66 thành D, R80 thành A và T82 thành K.

9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này có khả năng gắn kết đặc hiệu với c-Met.

10. Kháng thể theo điểm 9, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình hoạt hóa c-Met phụ thuộc vào phối tử và không phụ thuộc vào phối tử.

11. Kháng thể theo điểm 10, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này ức chế quá trình dimer hoá c-Met.

12. Kháng thể theo điểm 11, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này ức chế ít nhất 50% khả năng tăng sinh tế bào của khối u đối với ít nhất một loại khối u.

13. Axit nucleic phân lập được, ADN hoặc ARN, mã hoá kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá có chức năng của nó, như được xác định trong các điểm

1 và 2.

14. Axit nucleic phân lập được theo điểm 13, khác biệt ở chỗ, axit nucleic này được chọn từ các axit nucleic sau:

- a) axit nucleic có trình tự ADN bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 64, SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 66 và các trình tự nêu trong SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68 và SEQ ID No. 69;
- b) axit nucleic có trình tự ADN bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 70 và SEQ ID No. 71.

15. Vật truyền chứa axit nucleic theo điểm 13 hoặc 14.

16. Tế bào chủ chứa vật truyền theo điểm 15.

17. Quy trình sản xuất kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2 và 4-12, khác biệt ở chỗ, quy trình này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 16, trong môi trường và trong các điều kiện nuôi cấy thích hợp; và
- b) thu hồi các kháng thể nêu trên, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của chúng, từ môi trường nuôi cấy hoặc các tế bào nuôi cấy nêu trên.

18. Chế phẩm chứa hoạt chất là hợp chất bao gồm kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá có gắn kết với c-Met của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 4-12, hoặc thu được bằng quy trình theo điểm 17, hoặc được tạo ra bởi tế bào lai theo điểm 3.

19. Chế phẩm theo điểm 18, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này còn chứa ít nhất một kháng thể kháng khối u.

20. Chế phẩm theo điểm 18, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào .

21. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 20, khác biệt ở chỗ , kháng thể này, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, được tiếp hợp với độc tố tế bào và/hoặc nguyên tố phóng xạ.

22. Phương pháp chẩn đoán *in vitro* các bệnh do sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường của thụ thể c-Met bắt đầu từ mẫu sinh học, trong đó thụ thể c-Met bị nghi là có mặt ở mức không bình thường, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học này tiếp xúc với kháng thể, hoặc một trong số các đoạn nhị giá gắn kết với c-Met của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1, 2, 4-12, hoặc thu được bởi quy trình theo điểm 17, hoặc được tạo ra bởi tế bào lai theo điểm 3, kháng thể này có thể được đánh dấu, nếu cần

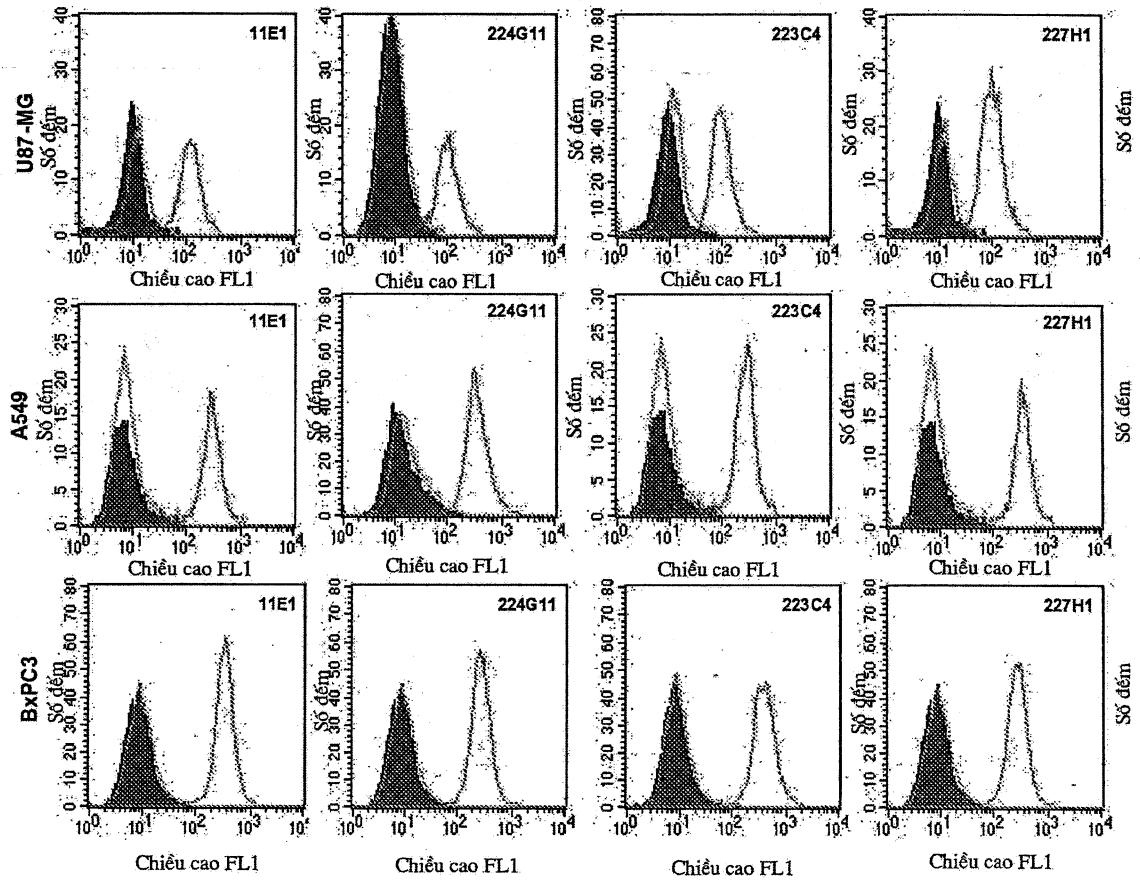


Fig.1



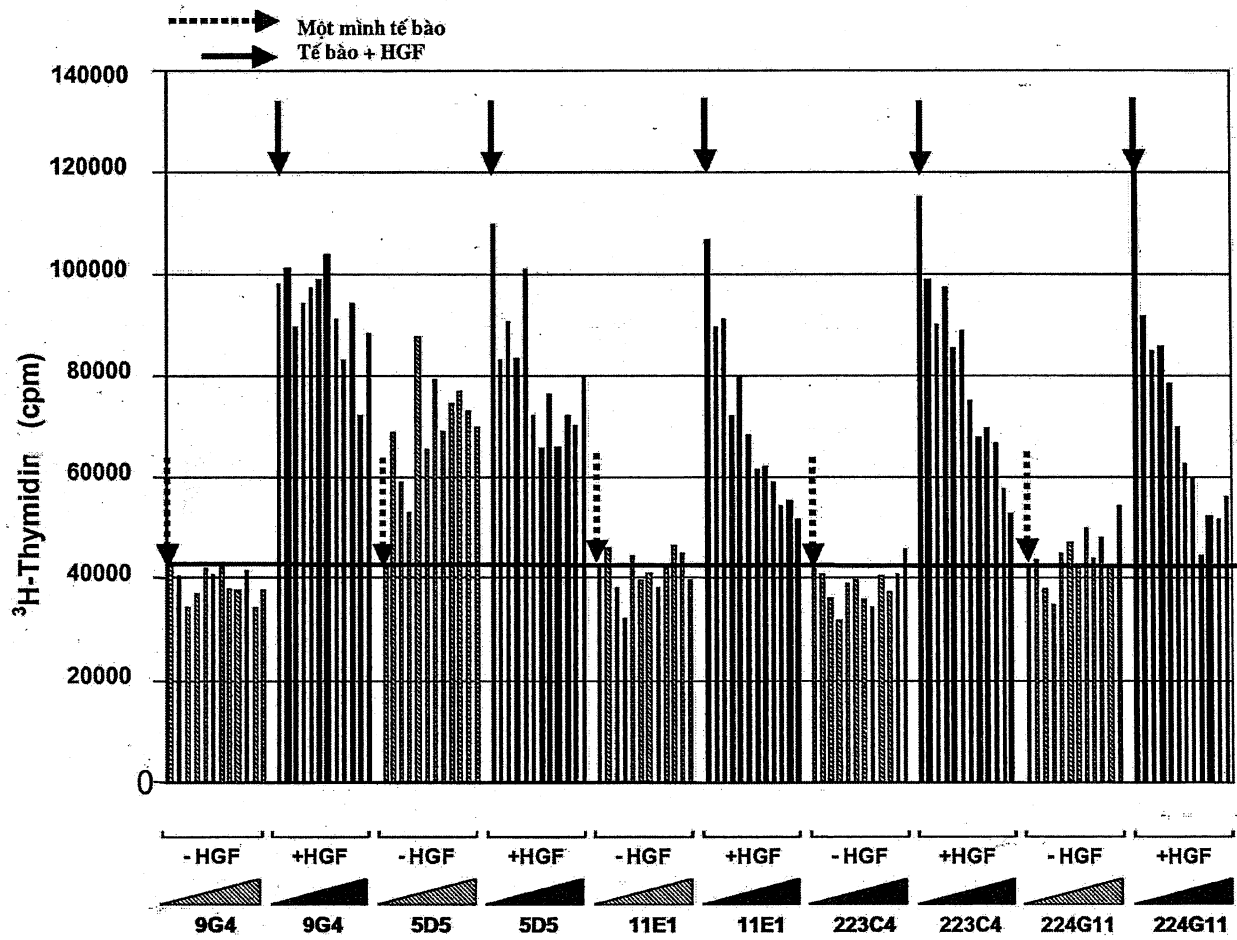


Fig.2A

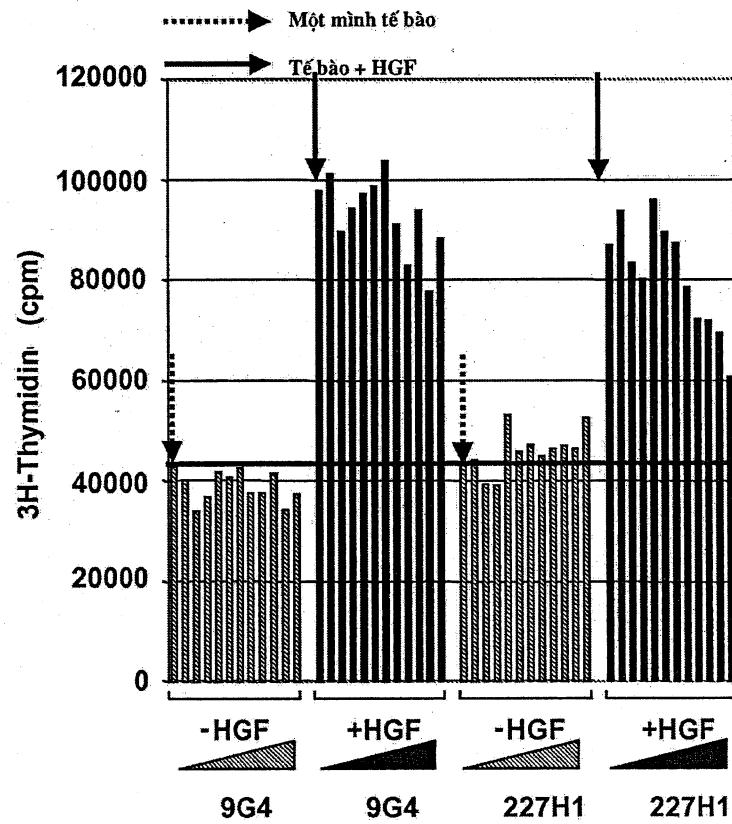


Fig.2B

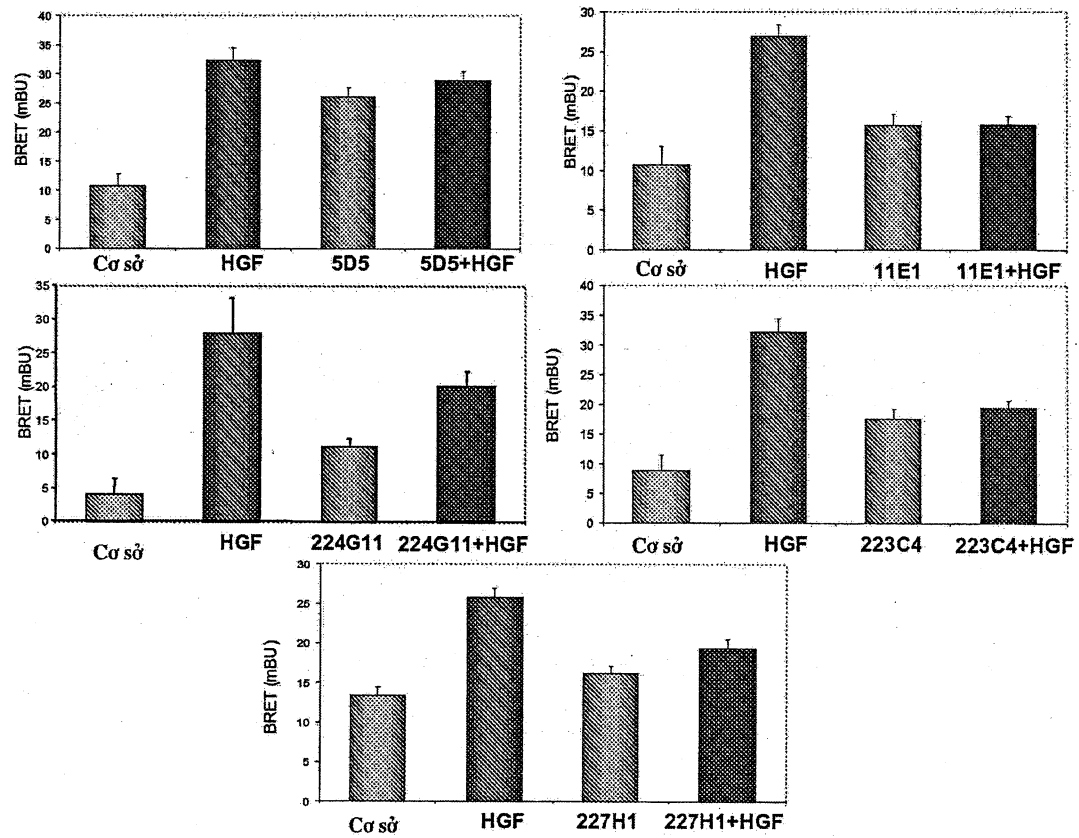


Fig.3

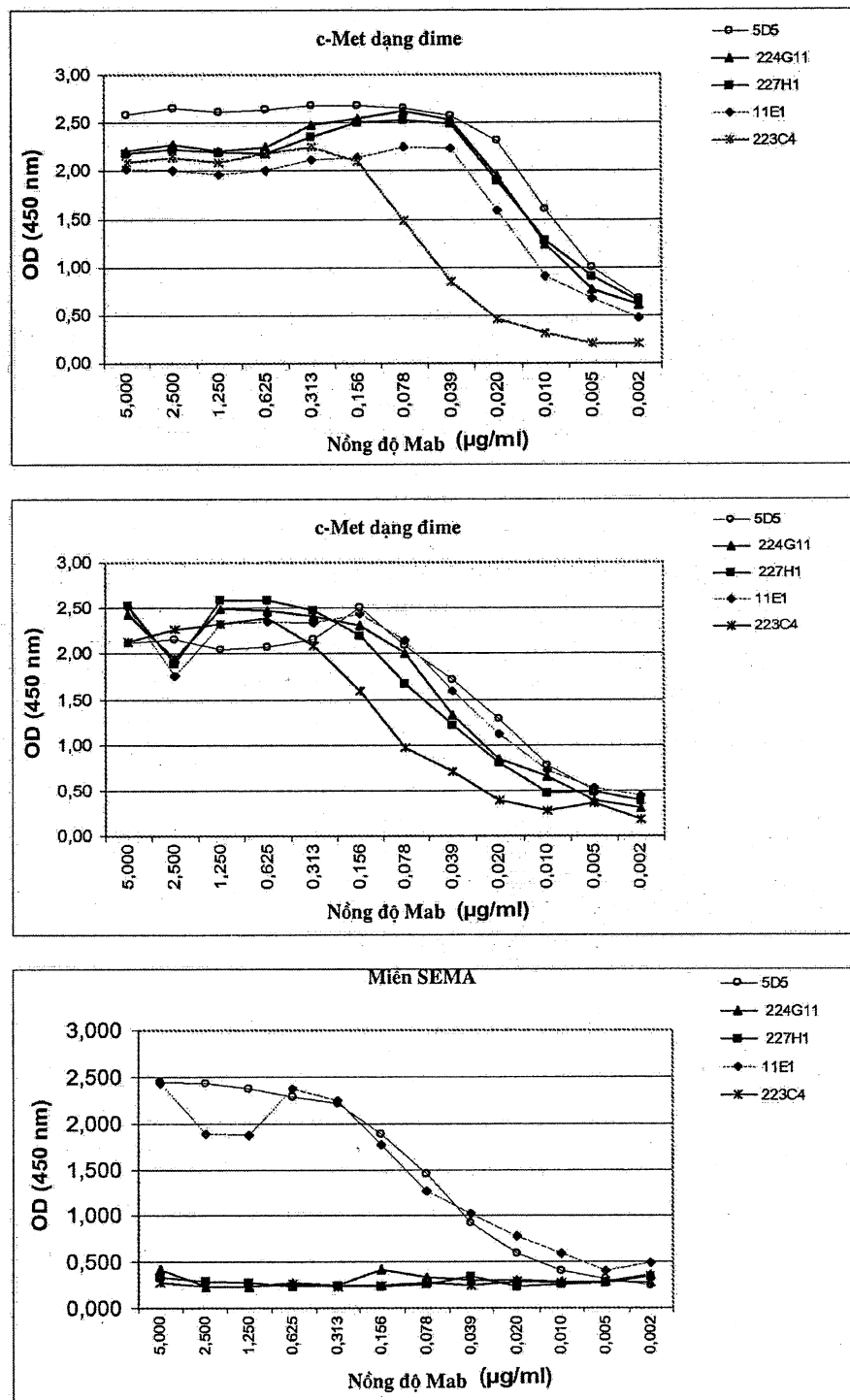
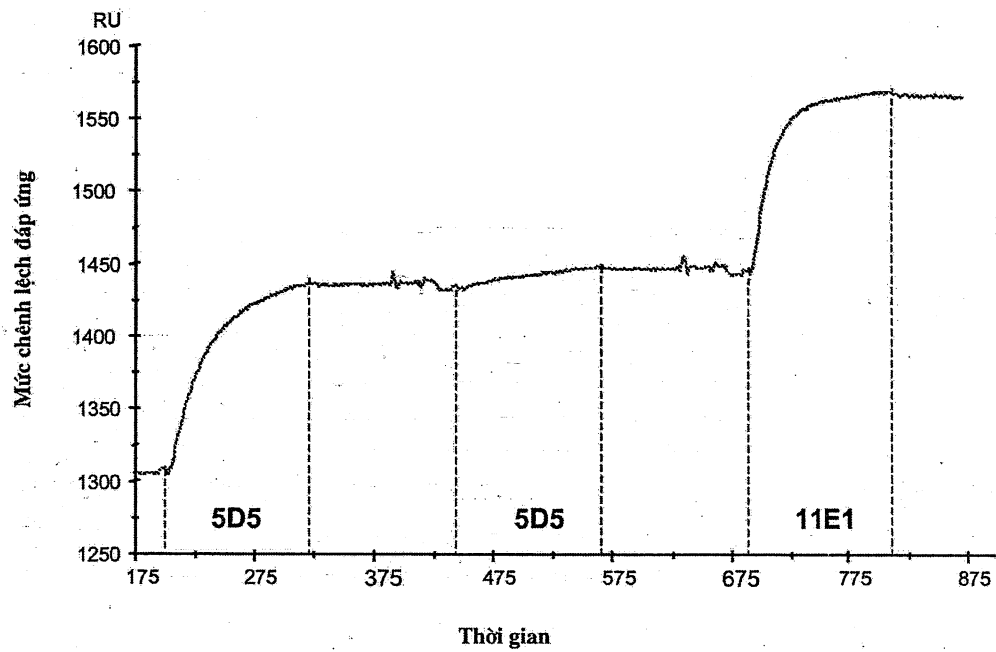
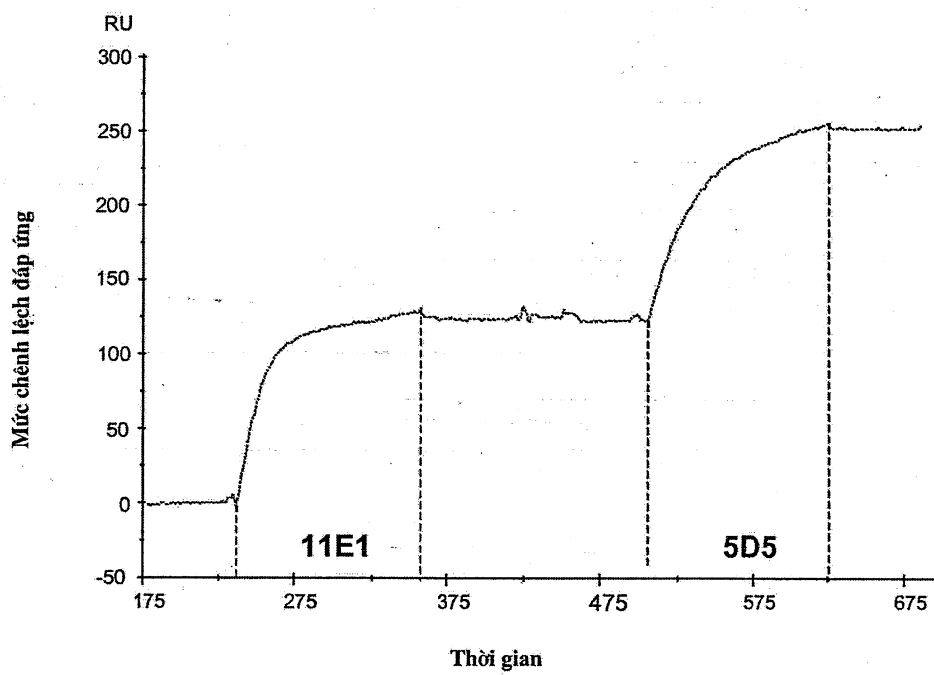
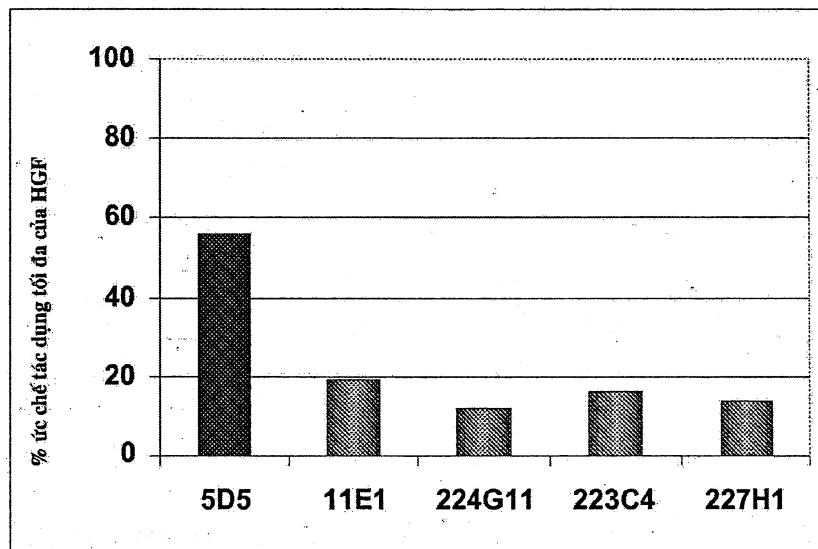
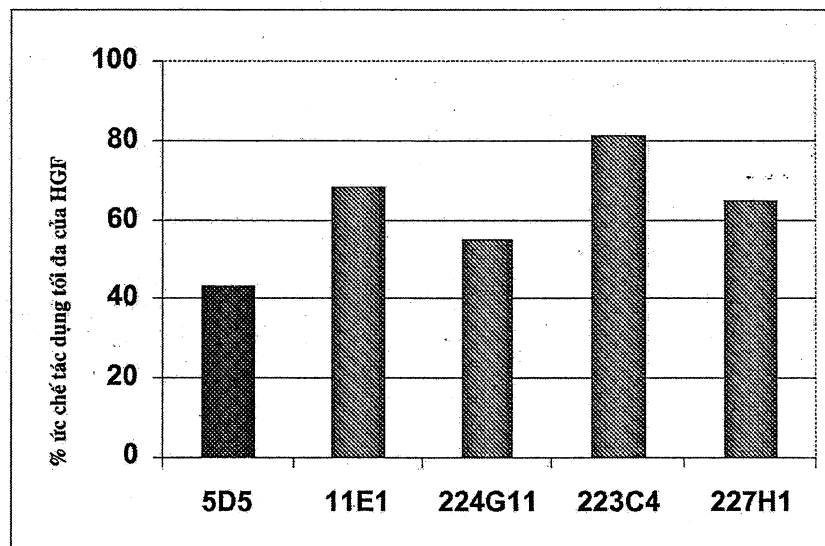


Fig.4

**Fig.5A****Fig.5B**

**Fig.6A****Fig.6B**

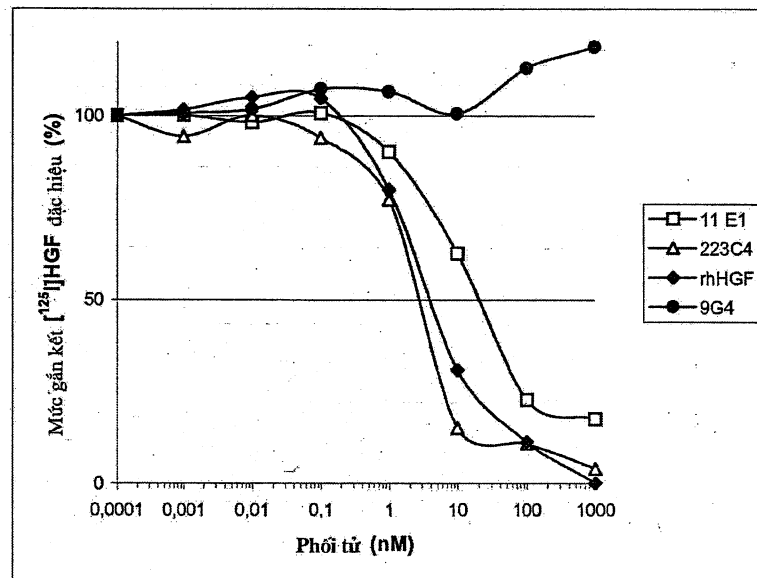


Fig.7A

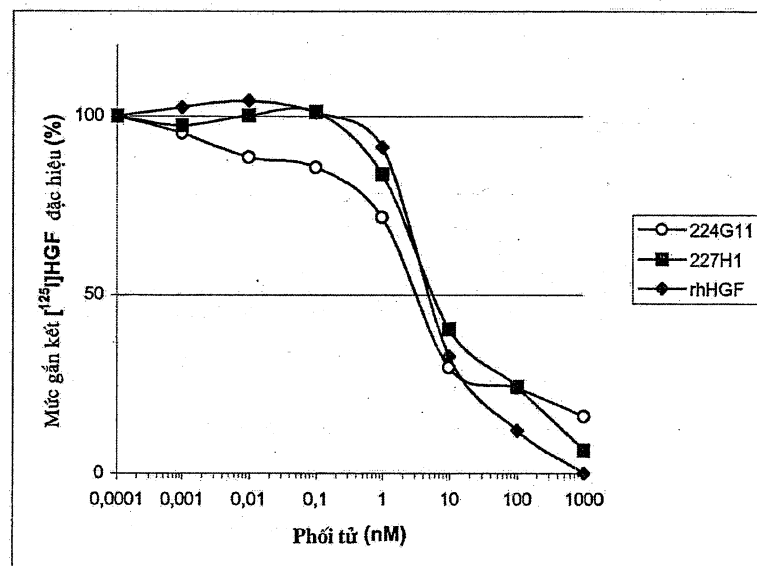
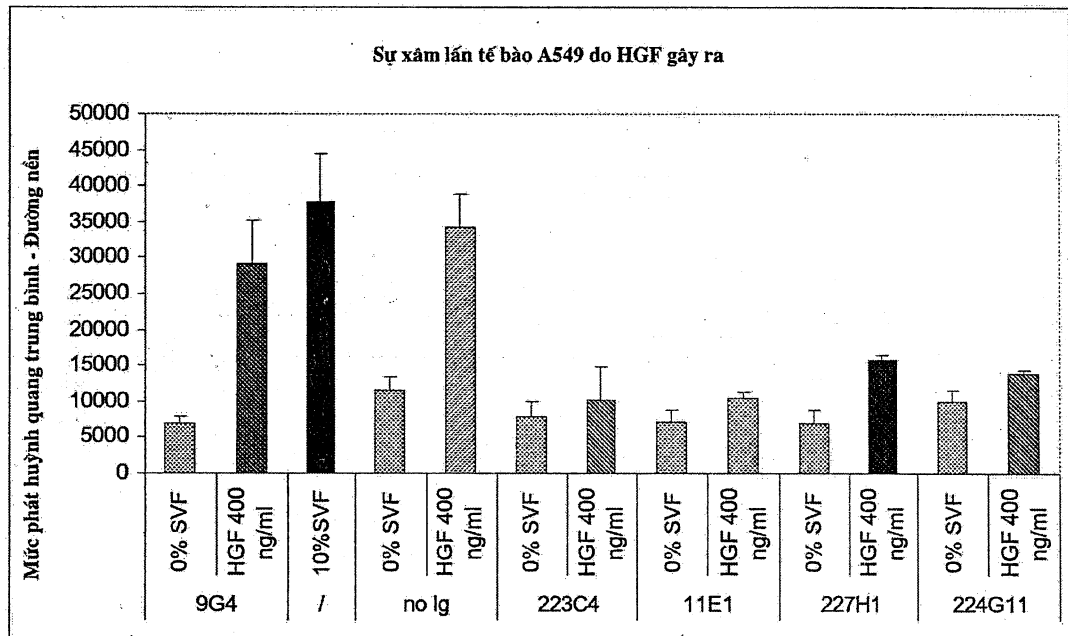
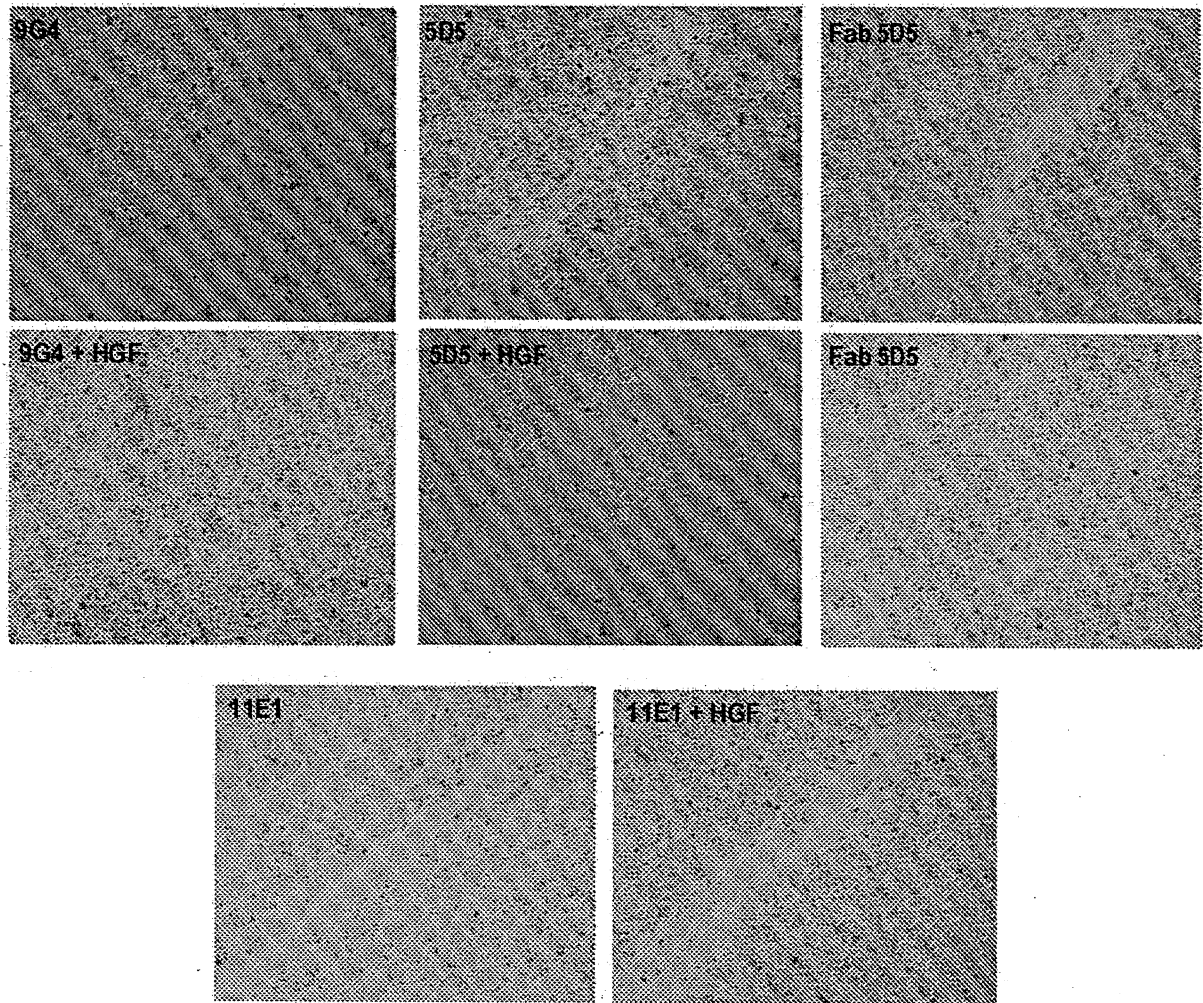


Fig.7B

**Fig.8**



**Fig.9**

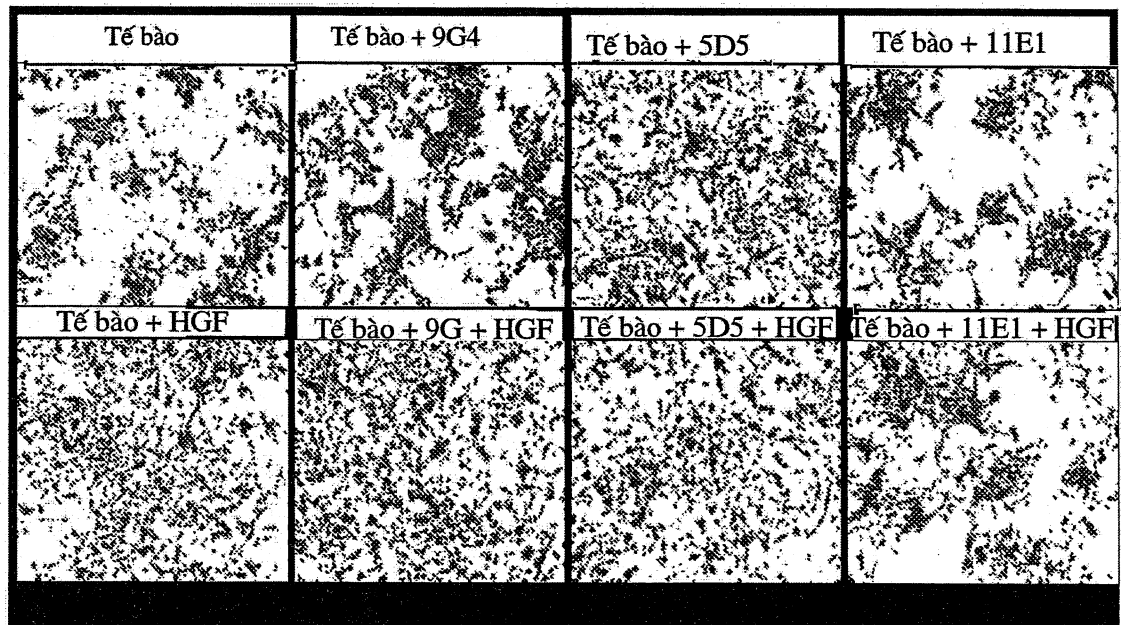


Fig.10A

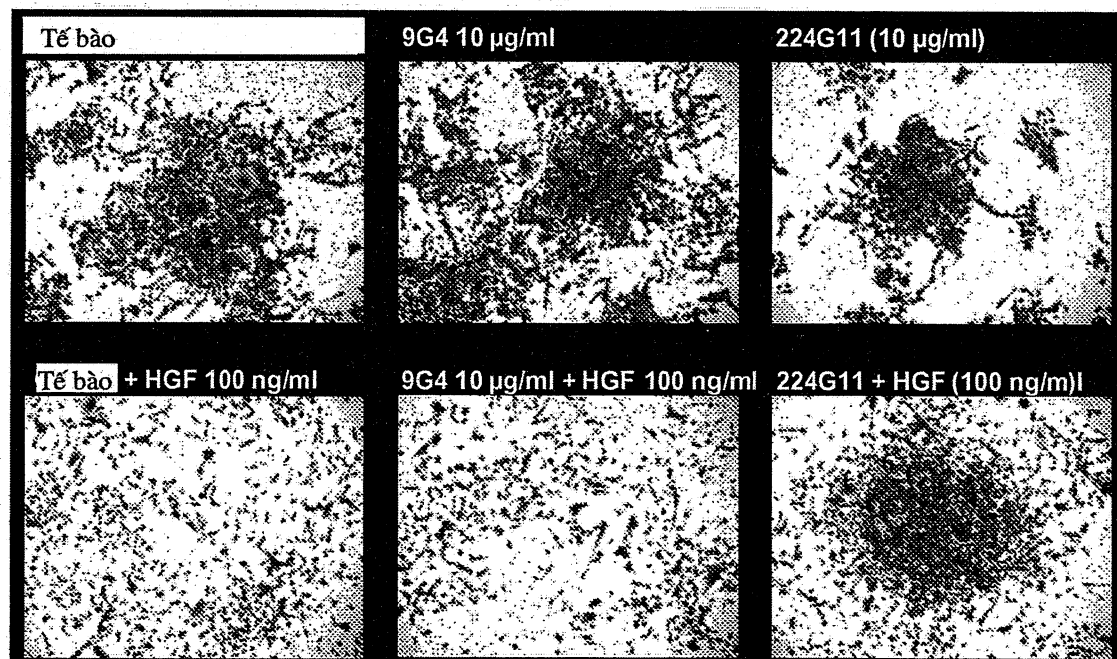
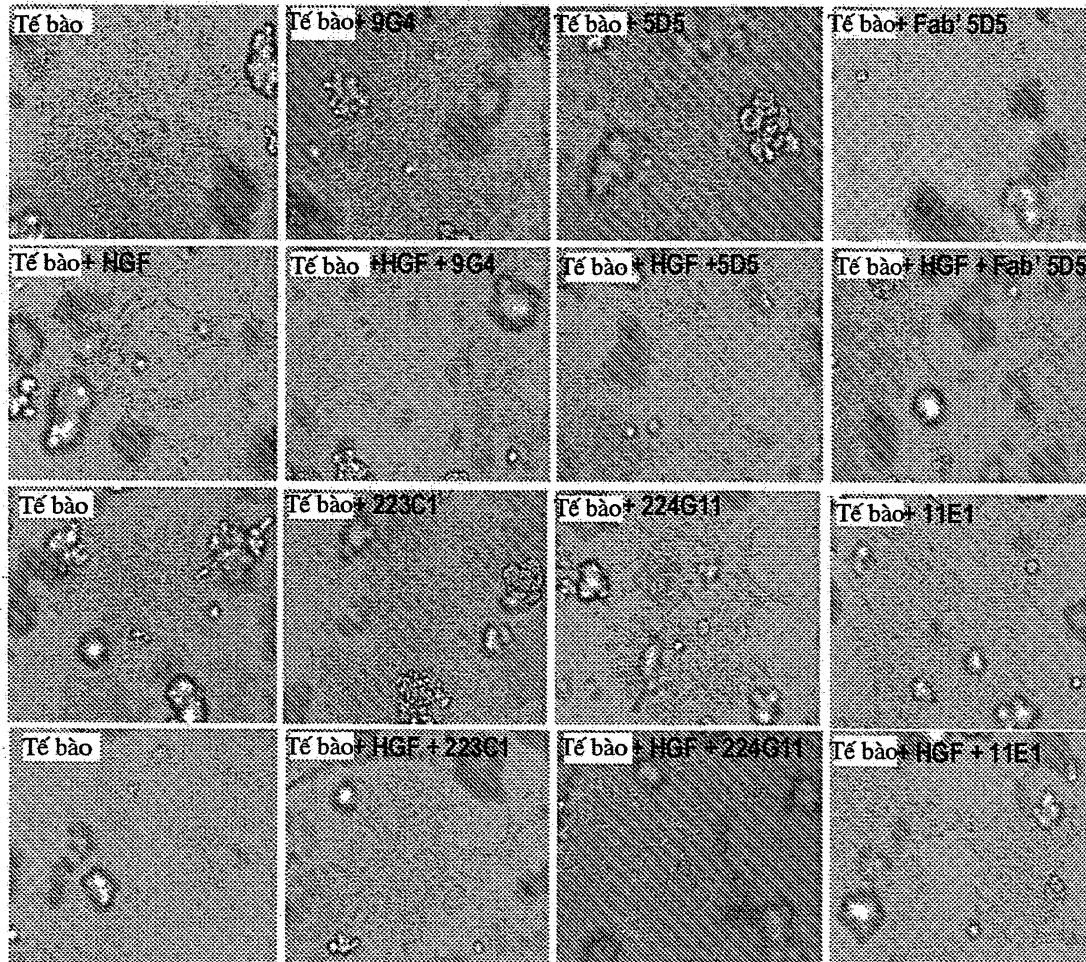


Fig.10B

**Fig.11**

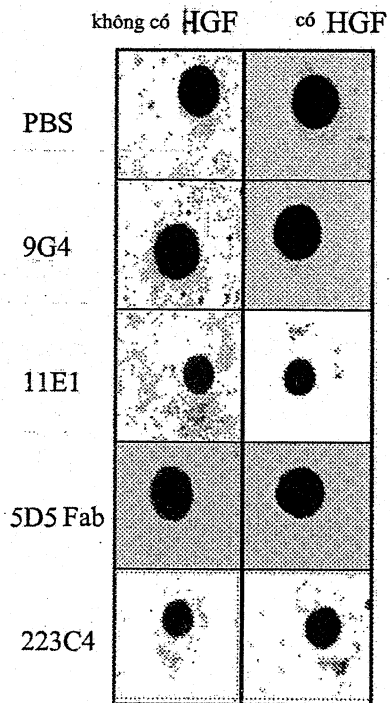


Fig.12A

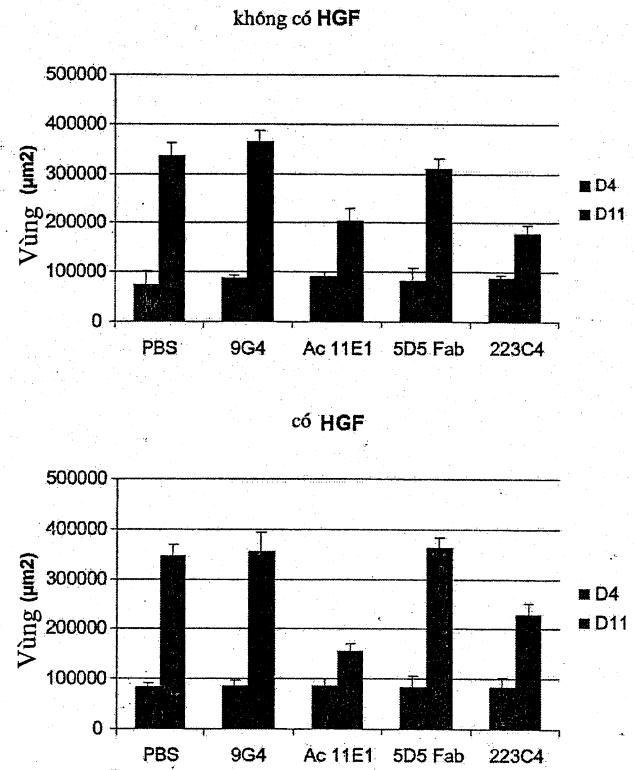


Fig.12B

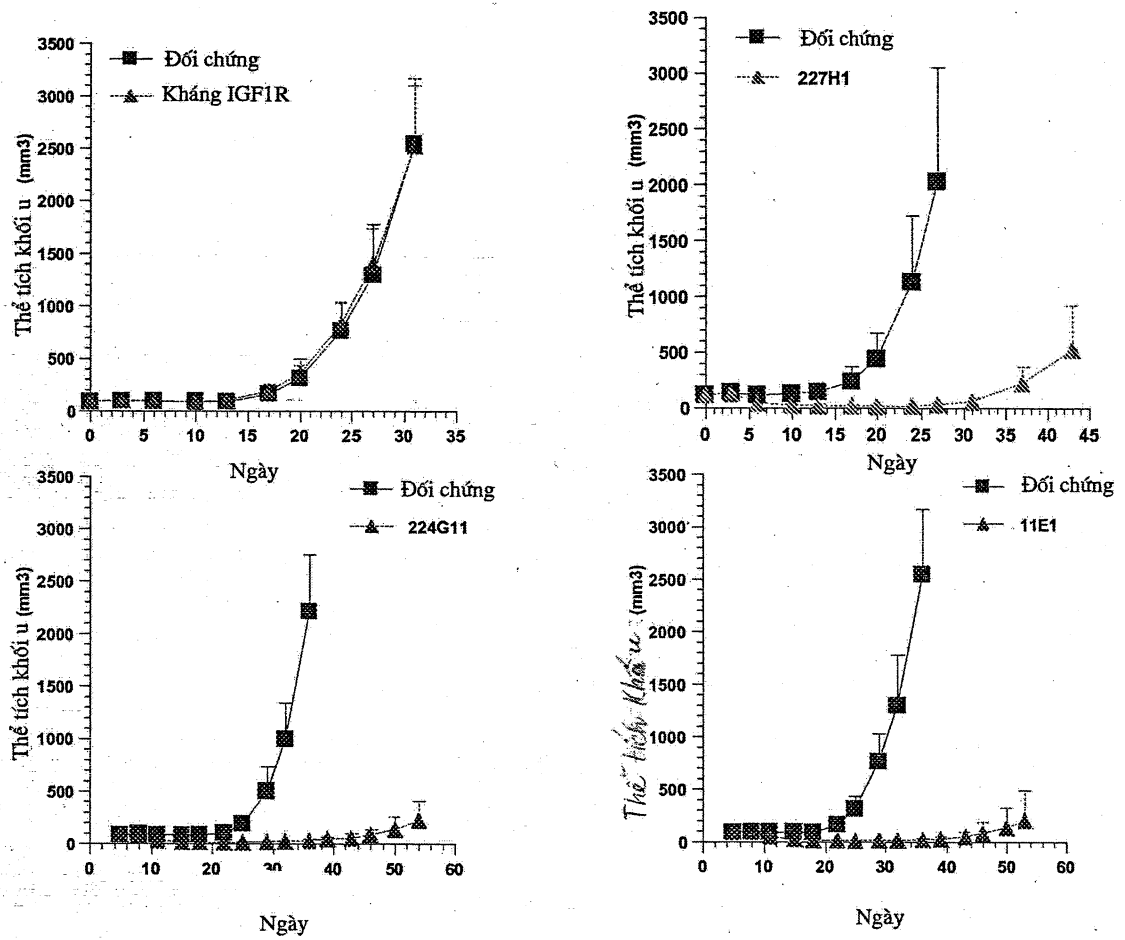


Fig.13

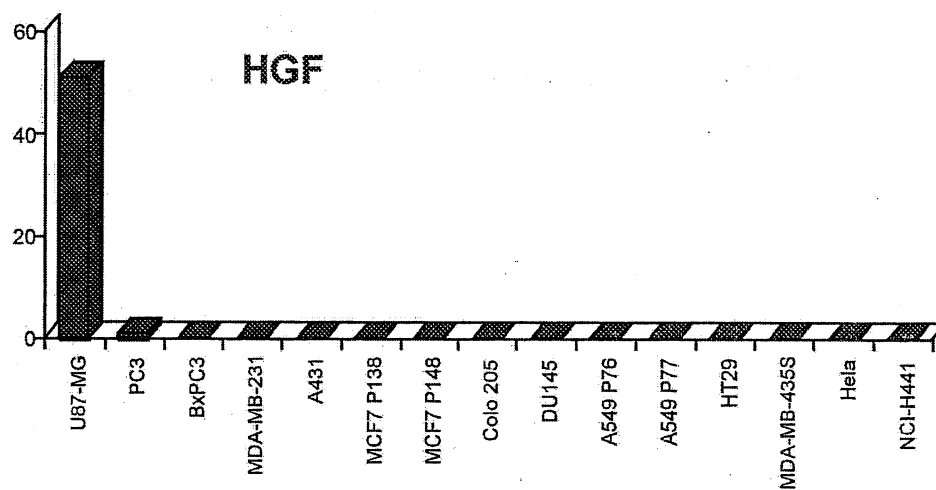
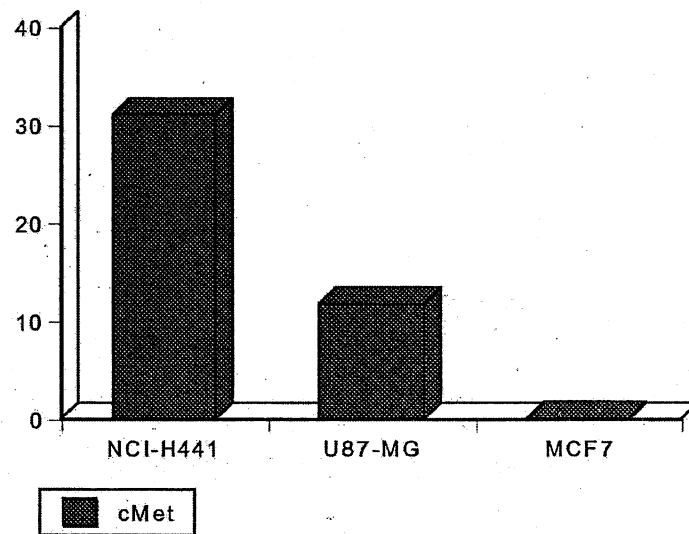
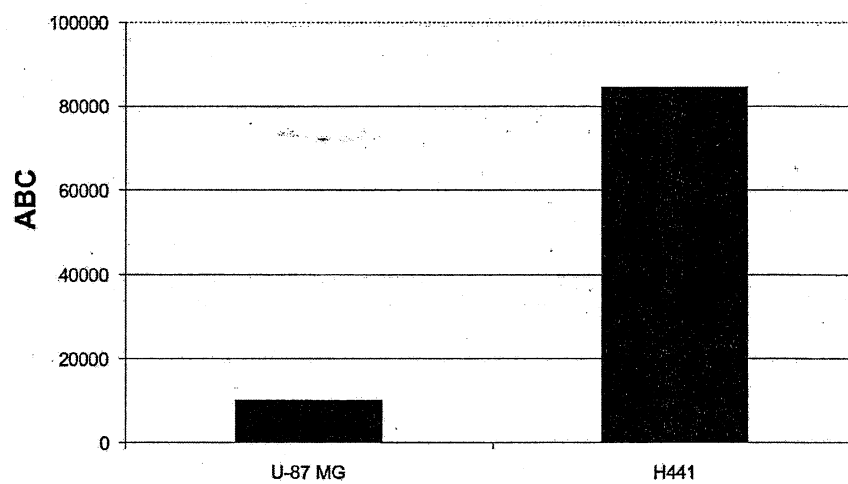
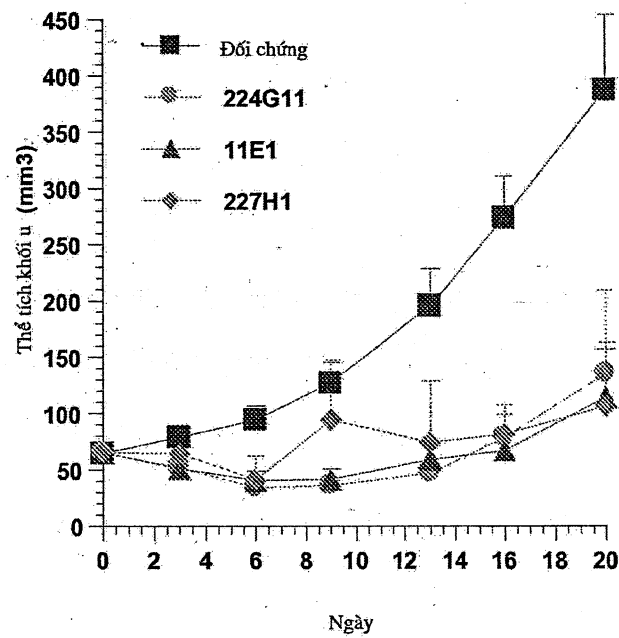


Fig.14

**Fig.15A****Fig.15B**

**Fig.16**

```

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01
-----
<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
D I V L T Q S P A S L A V S L
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
-----
224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01
-----
----->
20      25      30
G Q R A T I S C R A S E S V D
ggg cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat
-----
224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01
-----
CDR1 - IMGT
35      40      45
S Y A N S F M H W Y Q Q K
agt tat gcc aat agt ttt ... atg cac tgg tac cag cag aaa
G
-g-
-----
FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P G Q P P K L L I Y R A S
cca gga cag cca ccg aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ...
-----
- IMGT -----<-----
65      70      75
N L E S G I P A R
... aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
-----
224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01
-----
FR3 - IMGT -----
80      85      90
F S G S G S R T D F T L T
ttc agt ggc agt ggg ... tct agg aca gac ttc acc ctc acc
-----
224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01
-----
----->
95      100      105
I N P V E A D D V A T Y Y C Q
att aat cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag
-----
224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01
-----
CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
110      115      120
Q S K E D P L T F G S G T K L
caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tog ggg aca aaa ttg
N
-t- -c
----->
123
E M K
gaa atg aaa
224G11 VL

```

Fig.17A



224G11 VL

V00777 IGKJ4\*01

224G11 VL

V00777 IGKJ4\*01

```

      CDR3 - IMGT      <----- FR4 - IMGT
              110              115              120
Q S K E D P L T F G S G T K L
caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tog ggg aca aaa ttg
-----g-----
----->
              123
E M K
gaa atg aaa
I
---a--- o

```

**Fig.17B**

|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |     |       |      |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-------|------|
| -----<----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     | FR1 | -     | IMGT |
| 1           | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |      |     |     |     |       |      |
| d           | I   | V   | L   | T   | Q   | S   | P   | A   | S   | L    | A   | V   | S   | L     |      |
| gac         | att | gtg | ctg | acc | caa | tct | cca | gct | tct | ttg  | gct | gtg | tct | cta   |      |
| E           |     |     |     |     |     |     |     |     | T   |      | S   |     | L   | P     |      |
| --a         | --  | --  | --  | t-- | --a | --g | --  | --  | --c | a--c | c-- | t-- | t-- | --c-- |      |
|             |     |     |     | M   |     |     |     |     | D   |      |     |     |     |       |      |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|----|--|--|--|----|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | →   |     |  |  |    |  |  |  |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 20  |     |  |  | 25 |  |  |  | 30 |
| G   | Q   | R   | A   | T   | I   | S   | C   | R   | A   | S   | E   | S   | V   | D   |  |  |    |  |  |  |    |
| ggg | cag | agg | gcc | acc | ata | tcc | tgc | aga | gcc | agt | gaa | agt | gtt | gat |  |  |    |  |  |  |    |
|     | E   |     |     |     | L   |     |     |     |     |     | Q   |     |     | S   |  |  |    |  |  |  |    |
| --- | g-a | --- | --- | --- | c-c | --- | --- | -g  | --- | --- | c-g | --- | --- | ago |  |  |    |  |  |  |    |
|     | E   |     |     |     |     | N   |     | K   |     |     | Q   |     |     | L   |  |  |    |  |  |  |    |

|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |        |     |     |     |     |     |     |     |     |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| CDR1 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <----- |     |     |     |     |     |     |     |     |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 35          |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 40     |     |     |     |     |     |     |     |     |  | 45 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| S           | Y   | A   | N   | S   | F   | .   | .   | .   | .   | M      | H   | W   | Y   | Q   | Q   | K   |     |     |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| agt         | tat | gcc | aat | agt | ttt | ... | ... | ... | ... | atg    | cac | tgg | tac | cag | cag | aaa |     |     |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| .           | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | L      | A   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --c         | --c | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | t-a    | gc- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|             |     |     | N   |     |     | N   | Y   |     |     | L      | A   |     |     |     |     |     |     |     |  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |        |  |  |  |  |  |  |  |      |  |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--------|--|--|--|--|--|--|--|------|--|
| FR2 - IMG |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |        |  |  |  |  |  |  |  | CDR2 |  |
|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  | -----> |  |  |  |  |  |  |  |      |  |
| 50        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  | 55     |  |  |  |  |  |  |  | 60   |  |
| P         | G   | Q   | P   | P   | K   | L   | L   | I   | Y   | R   | A   | S   |     |     |  |        |  |  |  |  |  |  |  |      |  |
| cca       | gga | cag | cca | ccc | aaa | ctc | ctc | atc | tat | cgt | gca | tcc | ... | ... |  |        |  |  |  |  |  |  |  |      |  |
|           |     |     | A   |     | R   |     |     |     |     | D   |     |     |     |     |  |        |  |  |  |  |  |  |  |      |  |
| --t       | --c | --- | g-t | --- | -gg | --- | --- | --- | --- | ga- | --- | --- | ... | ... |  |        |  |  |  |  |  |  |  |      |  |
|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     | W   |     |     |     |     |  |        |  |  |  |  |  |  |  |      |  |

```

- IMGT      65      70      75
      N   L   E   S   G   I   P       A   R
      aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
           R   A   T
      --- agg -cc a-- -c --- -a ...
      T   R               V           D

```

[illegible]

|     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 95  | 100 |  |  |  |  | 105 |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|-----|
| I   | N    | P   | V   | E   | A   | D   | D   | V   | A   | T   | Y   | Y   | C   | Q   |  |  |  |  |     |
| att | aat  | cct | gtg | gag | gct | gat | gat | gtt | gca | acc | tat | tac | tgt | cag |  |  |  |  |     |
|     | S    | S   | L   |     | P   | E   |     | F   |     | V   |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
| --c | --gc | agc | c-a | --- | c-- | --a | --- | t-- | --- | gtt | --- | --- | --- | --- |  |  |  |  |     |
|     | S    | S   | L   | O   |     | E   |     |     |     | V   |     |     |     |     |  |  |  |  |     |

| CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     | FR4 - IMGT |     |     |     |     |     |     |  |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 110         |     |     |     |     |     |     |     | 115        |     |     |     |     |     |     |  |
| Q           | S   | K   | E   | D   | P   | L   | T   | F          | G   | S   | G   | T   | K   | L   |  |
| caa         | agt | aag | gag | gat | cct | ctc | acg | ttc        | ggc | tgg | ggg | aca | aaa | tgc |  |
|             | R   | S   | N   | W   |     |     |     |            |     |     |     |     |     |     |  |
| --g         | c-- | gc  | a-c | tgg | --- | c   |     |            |     |     |     |     |     |     |  |
|             | Y   | Y   | S   | T   | P   |     |     |            |     |     |     |     |     |     |  |

----->  
123  
E M K  
gaa atg aaa

**Fig.18A**

|                   |        |      |     |        |       |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
|-------------------|--------|------|-----|--------|-------|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|
|                   | CDR3 - | IMGT |     | <----- | FR4 - | IMGT | ----- |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
|                   |        | 110  |     |        | 115   |      | 120   |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
| 224G11 VL         | Q      | S    | K   | E      | D     | P    | L     | T   | F   | G   | S   | G   | T   | K   | L       |     |
|                   | caa    | agt  | aag | gag    | gat   | cct  | ctc   | acg | ttc | ggc | tcg | ggg | aca | aaa | ttg     |     |
| AF103571 IGKJ4*02 |        |      |     |        |       |      |       |     |     |     | G   |     |     |     | V       |     |
|                   |        |      |     |        |       |      |       |     |     |     | gga | --- | --- | c   | --g g-- |     |
|                   | -----> |      |     |        |       |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
|                   |        |      |     |        |       |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         | 123 |
| 224G11 VL         | E      | M    | K   |        |       |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
|                   | gaa    | atg  | aaa |        |       |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
| AF103571 IGKJ4*02 |        |      | I   |        |       |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         |     |
|                   | --g    | ---  | --- | ---    | c     |      |       |     |     |     |     |     |     |     |         |     |

Fig.18B

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)         |                   |                   |                   | CDR1-IMGT<br>(27-38) |                   |                   |                   | FR2-IMGT<br>(39-55) |                   |                   |                   | CDR2-IMGT<br>(56-65) |                   |                   |                   |
|------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                  | 1                          | 10                | 20                |                   | 30                   |                   |                   |                   | 40                  | 50                |                   |                   | 60                   |                   |                   |                   |
| 224G11 VL        | ..... ..... .....          | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....    | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....   | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....    | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... |
|                  | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS | ESVDSYANSF..      | MHWYQQKPGQPPLLIY  | RAS.....          |                      |                   |                   |                   |                     |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |
|                  | 3                          | 3 33 2 3 3        |                   |                   |                      |                   |                   |                   | 11                  | 2 3               |                   |                   |                      |                   |                   |                   |
| Vùng khung người | E-----T-SL-P-E---L-----    | .....             | LA-----A-R-----   | .....             |                      |                   |                   |                   |                     |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |
| 224G11 HZ1VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS | ESVDSYANSF..      | MHWYQQKPGQAPRLLIY | RAS.....          |                      |                   |                   |                   |                     |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |

|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                    |                   |                   |                   | CDR3-IMGT<br>(105-113) |                   |                   |                   | FR4-IMGT<br>(114-123) |                   |                   |                   |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                  | 70                                      | 80                | 90                | 100               | 110                    |                   |                   |                   | 120                   |                   |                   |                   |
| 224G11 VL        | ..... ..... .....                       | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....      | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....     | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... |
|                  | NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC | QQSKEDPLT         | FGSGTKLEMK        |                   |                        |                   |                   |                   |                       |                   |                   |                   |
| Hạng             | 223                                     | 1                 | 323 33 2 3        |                   |                        |                   |                   |                   | 3                     | 3 3               |                   |                   |
| Vùng khung người | -RAT---G-----SSL-PE-F-V---              | .....             | ---G---V-I-       | .....             |                        |                   |                   |                   |                       |                   |                   |                   |
| 224G11 HZ1VL     | NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISLPEPDAVYYC   | QQSKEDPLT         | FGGGTKVEIK        |                   |                        |                   |                   |                   |                       |                   |                   |                   |

Fig.19A

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)         |                   |                   |                   | CDR1-IMGT<br>(27-38) |                   |                   |                   | FR2-IMGT<br>(39-55) |                   |                   |                   | CDR2-IMGT<br>(56-65) |                   |                   |                   |
|------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                  | 1                          | 10                | 20                |                   | 30                   |                   |                   |                   | 40                  | 50                |                   |                   | 60                   |                   |                   |                   |
| 224G11 VL        | ..... ..... .....          | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....    | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....   | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....    | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... |
|                  | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS | ESVDSYANSF..      | MHWYQQKPGQPPLLIY  | RAS.....          |                      |                   |                   |                   |                     |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |
|                  | 1 3 3 3 32                 |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   | 11                  |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |
| Vùng khung người | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS | .....             | LAWYQQKPGQPPLLIY  | .....             |                      |                   |                   |                   |                     |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |
| 224G11 HZ2VL     | DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS | ESVDSYANSF..      | MHWYQQKPGQPPLLIY  | RAS.....          |                      |                   |                   |                   |                     |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |

|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                    |                   |                   |                   | CDR3-IMGT<br>(105-113) |                   |                   |                   | FR4-IMGT<br>(114-123) |                   |                   |                   |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                  | 70                                      | 80                | 90                | 100               | 110                    |                   |                   |                   | 120                   |                   |                   |                   |
| 224G11 VL        | ..... ..... .....                       | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....      | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... .....     | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... | ..... ..... ..... |
|                  | NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC | QQSKEDPLT         | FGSGTKLEMK        |                   |                        |                   |                   |                   |                       |                   |                   |                   |
|                  | 22 3 3 1 3233 3 3                       |                   |                   |                   |                        |                   |                   |                   | 3                     | 3 3               |                   |                   |
| Vùng khung người | TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC  | .....             | FGGGTKVEIK        | .....             |                        |                   |                   |                   |                       |                   |                   |                   |
| 224G11 HZ2VL     | TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC  | QQSKEDPLT         | FGGGTKVEIK        |                   |                        |                   |                   |                   |                       |                   |                   |                   |

Fig.19B

```

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
E V Q L Q Q S G P ... E L V K P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
-----

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
----->
20      25      30
G A S V K I S C K T S G Y I F
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag act tct gga tac ata ttc
P A T
c- g- -c-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T A Y T ... M H W V R Q S
act gca tac acc ... atg cac tgg gtg agg cag agc
D N D K
-ac -a- ... -g- -a-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
L G E S L D W I G G I K P N N
ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
H K E D N
-a- -a- -g- -a- -t- -t-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
- IMGT <-----
65      70      75
G L A ... N Y N Q K F K ... G K
ggt ctt gct ... aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
G T I
gg- a- -t-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
FR3 - IMGT ----->
80      85      90
A T L T V D K S S S T A Y M D
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
E
-----g

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
----->
95      100      105
L R S L T S E D S A V Y Y C A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
T
-c a-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
CDR3 - IMGT <-----
110      115      120
R S E I T T E F D Y W G Q G T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc
---

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01
FR4 - IMGT ----->
126
A L T V S S
gct ctc aca gtc tcc tca

```

Fig.20A

224G11 VH  
J00431 IGHD2-4\*01

**Fig.20B**

224G11 VH  
V00770 IGHJ2\*01

**Fig.20C**

[illegible]

**Fig.21A**

|                 |                                                             |        |            |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|--------|------------|
|                 | CDR3 - IMGT                                                 | <----- | FR4 - IMGT |
|                 | 110                                                         | 115    | 120        |
| 224G11 VH       | R S E I T T E F D Y W G Q G T                               |        |            |
|                 | aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc |        |            |
| J00256 IGHJ4*01 | ..... Y                                                     |        |            |
|                 | ..... ac t-c                                                |        | ..... a    |
|                 | ----->                                                      |        |            |
|                 | 126                                                         |        |            |
| 224G11 VH       | A L T V S S                                                 |        |            |
|                 | gct ctc aca gtc tcc tca                                     |        |            |
|                 | L V                                                         |        |            |
| J00256 IGHJ4*01 | ctg g- -c - - - - g                                         |        |            |

Fig.21B



|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)                      |                                 |                     |            | CDR1-IMGT<br>(27-38) |  | FR2-IMGT<br>(39-55)    |    | CDR2-IMGT<br>(56-65)  |    |
|------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------|----------------------|--|------------------------|----|-----------------------|----|
|                  | 1                                       | 10                              | 20                  |            | 30                   |  | 40                     | 50 |                       | 60 |
| 224G11 VH        | EVQLQ                                   | QSGP                            | ELVKPGASVKISCKTS    |            | GYIFTAYT....         |  | MHWVRQSLGESLDWIGG      |    | IKPNNGLA..            |    |
| Hàng             | 3                                       | 3                               | 3 33                |            | 3 2                  |  | 33 22 1 2 1            |    |                       |    |
| Vùng khung người | Q---V---A.-VK-----V---A-                |                                 |                     |            |                      |  | -----AP-QG-E-M-W       |    |                       |    |
| 224G11 HZVH      | QVQLVQSGA                               | EVKKPGASVKVSCAS                 |                     |            | GYIFTAYT....         |  | MHWVRQAPGQGLDWMGG      |    | IKPNNGLA..            |    |
|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                    |                                 |                     |            |                      |  | CDR3-IMGT<br>(105-115) |    | FR4-IMGT<br>(116-126) |    |
|                  | 70                                      | 80                              | 90                  | 100        |                      |  | 110                    |    | 120                   |    |
| 224G11 VH        | NYNQKFK                                 | GKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC |                     |            |                      |  | ARSEITTEFDY            |    | WGQGTALTIVSS          |    |
| Hàng             | 3                                       | 3                               | 32 2 1 1 3          | 2 33 3 3 3 |                      |  |                        |    | 33                    |    |
| Vùng khung người | --A---Q.-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T----- |                                 |                     |            |                      |  |                        |    | -----LV-----          |    |
| 224G11 HZVH      | NYAQKFQ                                 | GRVTMTVDKSI                     | STAYMELSRLSDDTAVYYC |            |                      |  | ARSEITTEFDY            |    | WGQGTALTIVSS          |    |

Fig.22

```

227H1 VL
K02161 IGKV3-5*01
<----- FR1 - IMGT -----
1 5 10 15
G I V L T Q S P A S L A V S L
ggc att gtg ttg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
D
-a- - - - c- - - - -
----->
20 25 30
G Q R A T I S C R V S E S I D
gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc agt gaa agt att gat
A V
--g - - - - -c- - - - -g- - - -
CDR1 - IMGT -----<-----
35 40 45
T Y G N S F I H W Y Q Q K
act tat ggc aat agt ttt ... .. ata cac tgg tac cag cag aaa
S M
-g- - - - -g- - - - -
FR2 - IMGT ----->----- CDR2
50 55 60
P G Q P P K L L I Y R A S
cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
----->-----
IMGT -----<-----
65 70 75
N L E S G I P A R
... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... ggc agg
... .. - - - - -
FR3 - IMGT -----
80 85 90
F S G S G S R T D F T L T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
... .. - - - - -
----->-----
95 100 105
I N P V E A D D S A T Y Y C Q
att aat cct gtg gag gct gat gat tct gca acc tat tac tgt cag
V
- - - - -gt- - - - -
CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
110 115 120
Q S N E D P F T F G S G T K L
caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
- - - - -t cc
----->
123
E M K
gaa atg aaa
227H1 VL

```

Fig.23A

```

          CDR3 - IMGT          <----- FR4 - IMGT
          110          115          120
Q   S   N   E   D   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L
caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

----->
          123
E   M   K
gaa atg aaa
I
--- --a --- c

```

227H1 VL

V00777 IGKJ4\*01

227H1 VL

V00777 IGKJ4\*01

Fig.23B

<-----> FRI - IMGT

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| G   | I   | V   | L   | T   | Q   | S   | P   | A   | S   | L   | A   | V   | S   | L   |
| ggc | att | gtg | ttg | acc | caa | tct | cca | gct | tct | ttg | gct | gtg | tct | cta |
| E   |     |     |     |     |     |     |     |     | T   |     | S   | L   |     | P   |
| -aa | --- |     |     | -a  | -g  | --- |     | -c  | a-c | c-  | t-- | t-- | --- | -c- |
| D   |     |     | M   |     |     |     |     | D   |     |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | →   |     |     |  |
| 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 25  |     | 30  |     |     |  |
| G   | Q   | R   | A   | T   | I   | S   | C   | R   | V   | S   | E   | S   | I   | D   |  |
| gga | cag | agg | gcc | acc | ata | tcc | tgc | aga | gtc | agt | gaa | agt | att | gat |  |
|     | E   |     |     |     | L   |     |     |     | A   |     | Q   |     | V   | S   |  |
| --g | -g  | -a  | --  | --  | -c  | -c  | --  | --g | -c  | --  | -c  | -g  | --  | -g  |  |
|     | E   |     |     |     |     | N   |     | K   | S   |     | Q   |     | V   |     |  |

|             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| CDR1 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 35          |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 40     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 45  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| T           | Y   | G   | N   | S   | F   |     |     |     |     | I      | H   | W   | Y   | Q   | Q   | K   |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| act         | tat | ggc | aat | agt | ttt | ... | ... | ... | ... | ata    | cac | tgg | tac | cag | cag | aaa |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| S           |     |     |     |     |     |     |     |     |     | L      | A   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| -gc         | -c  | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | t-     | gc- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Y           | S   | S   |     | N   | K   | N   | Y   |     |     | L      | A   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |        |     |     |      |    |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|------|----|
| FR2 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | -----> |     |     | CDR2 |    |
|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 50     |     |     | 55   | 60 |
| P          | G   | Q   | P   | P   | K   | L   | L   | I   | Y   | R   | A   | S      |     |     |      |    |
| cca        | gga | cag | cca | ccc | aaa | ctc | ctc | atc | tat | cgt | gca | tcc    | ... | ... |      |    |
|            |     |     | A   |     | R   |     |     |     |     | D   |     |        |     |     |      |    |
| --t        | --c | --- | g-t | --- | -gg | --- | --- | --- | --- | ga- | --- | ---    | ... | ... |      |    |
|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     | W   |     |        |     |     |      |    |

```

- IMGT      65      70      75
      N   L   E   S   G   I   P           A   R
... aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
      R   A   T
... agg -cc a- -c -a ...
      T   R           V           D

```

| FR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 80         |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |
| F          | S   | G   | S   | G   | S   | R   | T   | D   | F   | T   | L   | T   |     |     |
| ttc        | agt | ggc | agt | ggg | ... | ... | tct | agg | aca | gac | ttc | acc | ctc | acc |
|            |     |     |     |     | G   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|            |     |     |     |     | g   |     |     |     |     | -t  |     |     |     |     |
|            |     |     |     |     | G   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 95  |     | 100 |  |  |  |  | 105 |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|-----|
| I   | N    | P   | V   | E   | A   | D   | D   | S   | A   | T   | Y   | Y   | C   | Q   |     |  |  |  |  |     |
| att | aat  | cct | gtg | gag | gct | gat | gat | tct | gca | acc | tat | tac | tgt | cag |     |  |  |  |  |     |
|     | S    | S   | L   |     | P   | E   |     | F   |     | V   |     |     |     |     |     |  |  |  |  |     |
| --c | --gc | agc | c-a | --- | c-- | --a | --- | -t- | --- | gtt | --- | --- | --- | --- |     |  |  |  |  |     |
|     | S    | S   | L   | O   |     | E   |     | V   |     | V   |     |     |     |     |     |  |  |  |  |     |

|        |     |      |     |      |     |     |     |        |     |     |     |            |     |     |  |
|--------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|--|
| CDR3 - |     |      |     | IMGT |     |     |     | <----- |     |     |     | FR4 - IMGT |     |     |  |
| 110    |     |      |     |      |     |     |     | 115    |     |     |     | 120        |     |     |  |
| Q      | S   | N    | E   | D    | P   | F   | T   | F      | G   | S   | G   | T          | K   | L   |  |
| caa    | agt | aat  | gag | gat  | cca | ttc | acg | ttc    | ggc | tgc | ggg | aca        | aag | ttg |  |
|        | R   | S    | N   | W    |     |     |     |        |     |     |     |            |     |     |  |
| --g    | c-- | --gc | a-c | tgg  | --t | cc  |     |        |     |     |     |            |     |     |  |

----->  
123  
E M K  
qaa atg aaa

**Fig.24A**

|                   | CDR3 - IMGT                                                 |  | FR4 - IMGT |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|--|------------|
|                   | 110                                                         |  | 115        |
|                   | Q S N E D P F T F G S G T K L                               |  | 120        |
| 227H1 VL          | caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg |  |            |
| AF103571 IGKJ4*02 | L G                                                         |  | V          |
|                   | g c----- gga ---c--- g--                                    |  |            |
|                   | ----->                                                      |  |            |
|                   | 123                                                         |  |            |
|                   | E M K                                                       |  |            |
| 227H1 VL          | gaa atg aaa                                                 |  |            |
| AF103571 IGKJ4*02 | I                                                           |  |            |
|                   | --g --c --- c                                               |  |            |

Fig.24B

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)                      |  |          |  | CDR1-IMGT<br>(27-38)    |  |     |  | FR2-IMGT<br>(39-55)        |  |       |  | CDR2-IMGT<br>(56-65)    |  |  |  |
|------------------|-----------------------------------------|--|----------|--|-------------------------|--|-----|--|----------------------------|--|-------|--|-------------------------|--|--|--|
|                  | 1                                       |  | 10       |  | 20                      |  | 30  |  | 40                         |  | 50    |  | 60                      |  |  |  |
| 227H1 VL         | ..... ..... ..... .....                 |  |          |  | ..... ..... ..... ..... |  |     |  | ..... ..... ..... .....    |  |       |  | ..... ..... ..... ..... |  |  |  |
|                  | GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS              |  |          |  | ESIDTYGNSF..            |  |     |  | IHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....  |  |       |  |                         |  |  |  |
|                  | 3                                       |  | 3 33 2 3 |  | 3 2                     |  |     |  | 11                         |  | 2 3   |  |                         |  |  |  |
| Vùng khung người | E-----T-SL-P-E---L---A-                 |  |          |  | .....                   |  |     |  | LA-----A-R---              |  |       |  | .....                   |  |  |  |
| 227H1 HZ1VL      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS              |  |          |  | ESIDTYGNSF..            |  |     |  | IHWYQQKPGQAPRLLIY RAS..... |  |       |  |                         |  |  |  |
|                  |                                         |  |          |  |                         |  |     |  |                            |  |       |  |                         |  |  |  |
|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                    |  |          |  |                         |  |     |  | CDR3-IMGT<br>(105-113)     |  |       |  | FR4-IMGT<br>(114-123)   |  |  |  |
|                  | 70                                      |  | 80       |  | 90                      |  | 100 |  | 110                        |  | 120   |  |                         |  |  |  |
| 227H1 VL         | ..... ..... ..... .....                 |  |          |  | ..... ..... ..... ..... |  |     |  | ..... ..... ..... .....    |  |       |  | ..... ..... ..... ..... |  |  |  |
|                  | NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC |  |          |  | QQSNEDPFT               |  |     |  | FGSGTKLEMK                 |  |       |  |                         |  |  |  |
|                  | 223                                     |  | 1        |  | 323 33 2 3              |  |     |  |                            |  | 3 3 3 |  |                         |  |  |  |
| Vùng khung người | -RAT-----G-----SSL-PE-F-V---            |  |          |  | .....                   |  |     |  | --G---V-I-                 |  |       |  | .....                   |  |  |  |
| 227H1 HZ1VL      | NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISLPEPDAVYYC   |  |          |  | QQSNEDPFT               |  |     |  | FGGGTKVEIK                 |  |       |  |                         |  |  |  |

Fig.25A

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)                      |    |    |              | CDR1-IMGT<br>(27-38)   |     | FR2-IMGT<br>(39-55)       |       | CDR2-IMGT<br>(56-65) |    |
|------------------|-----------------------------------------|----|----|--------------|------------------------|-----|---------------------------|-------|----------------------|----|
|                  | 1                                       | 10 | 20 |              | 30                     |     | 40                        | 50    |                      | 60 |
| 227H1 VL         | ..... ..... .....                       |    |    |              | ..... .....            |     | ..... ..... .....         |       | ..... .....          |    |
|                  | GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS              |    |    |              | ESIDTYGNSF..           |     | IHWYQQKPGQPPLLIY RAS..... |       |                      |    |
|                  | 3                                       | 1  | 3  | 3 3 32       |                        |     | 11                        |       |                      |    |
| Vùng khung người | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS              |    |    |              | .....                  |     | LAWYQQKPGQPPLLIY          |       | .....                |    |
| 227H1 HZ2VL      | DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS              |    |    |              | ESIDTYGNSF..           |     | IHWYQQKPGQPPLLIY RAS..... |       |                      |    |
|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                    |    |    |              | CDR3-IMGT<br>(105-113) |     | FR4-IMGT<br>(114-123)     |       |                      |    |
|                  | 70                                      | 80 | 90 | 100          |                        | 110 |                           | 120   |                      |    |
| 227H1 VL         | ..... ..... ..... .....                 |    |    |              | ..... .....            |     | ..... .....               |       | ..... .....          |    |
|                  | NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC |    |    |              | QQSNEDPFT              |     | FGSGTKLEMK                |       |                      |    |
|                  | 22                                      | 3  | 3  | 1 3233 3 3 3 |                        |     |                           | 3 3 3 |                      |    |
| Vùng khung người | TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC  |    |    |              | .....                  |     | FGGGTKVEIK                |       |                      |    |
| 227H1 HZ2VL      | TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC  |    |    |              | QQSNEDPFT              |     | FGGGTKVEIK                |       |                      |    |

Fig.25B

```

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01
<----- FR1 - IMGT -----
1      5      10      15
E V Q L Q Q S G P E L V K P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gaa ctg gtg aag cct
-----g-----

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01
----->-----
20      25      30
G A S M K I S C K A S G Y S F
gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat tca ttc
V P T
--g-- --g-- --a c-- --a--c a--

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T D Y T L N W V K Q S
act gac tac acc ... ctg aac tgg gtg aag cag ago
N M D
--a- --a- g--

FR2 - IMGT ----->----- CDR2
50      55      60
H G K T L E W I G L I N P Y N
cat gga aag acc ctt gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat
S D N
--g- --ga- --a--

- IMGT <-----
65      70      75
G G T T Y N Q K F K G K
ggt ggt act ... acc tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
I
--t-

FR3 - IMGT ----->-----
80      85      90
A T L T V D K S S S T A Y M E
gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg gag
--g- --c-

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01
----->-----
95      100      105
L L S L T S E D S A V Y Y C A
ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
R T
--g- --c- --a--

CDR3 - IMGT <-----
110      115      120
R E E I T K D F D F W G Q G T
aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
---

FR4 - IMGT ----->
126
T L T V S S
act ctc aca gtc tcc tca

```

Fig.26A

227H1 VH  
IGHD1-1\*02

| CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 105         | 110 |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |
| A           | R   | E   | E   | I   | T   | K   | D   | F   | D   | F   |
| gca         | aga | gag | gaa | att | acg | aag | gac | ttt | gat | ttc |
| -t-         | -t- | gc- | --  |     |     |     |     |     |     |     |

Fig.26B

227H1 VH  
V00770 IGHJ2\*01

| CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <----- |     |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|
| 110         |     |     |     |     |     | 115 |     | 120 |     |        |     |     |     |     |
| R           | E   | E   | I   | T   | K   | D   | F   | D   | F   | W      | G   | Q   | G   | T   |
| aga         | gag | gaa | att | acg | aag | gac | ttt | gat | ttc | tgg    | ggc | caa | ggc | acc |
|             |     |     |     |     |     | Y   |     |     | Y   |        |     |     |     |     |
| ...         | ... | ... | ... | ... | ..c | t-- | --- | c-- | a-- | ---    | --- | --- | --- | --- |

FR4 - IMGT ----->

| 126 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| T   | L   | T   | V   | S   | S   |
| act | ctc | aca | gtc | tcc | tca |
| --- | --- | --- | --- | --- | g   |

227H1 VH  
V00770 IGHJ2\*01

Fig.26C



```

<-----FR1 - IMGT
1      5      10      15
E  V  Q  L  Q  Q  S  G  P      E  L  V  K  P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gaa ctg gtg aag cct
Q      V      A      V  K
c-- --g --- --gtg --- --g g-- ... --g g-- aa- ---
----->
20      25      30
G  A  S  M  K  I  S  C  K  A  S  G  Y  S  F
gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat tca ttc
V      V      T
--g --c --- g-- --g-c --- --a --c a-c ---
----->
CDR1 - IMGT
35      40      45
T  D  Y  T      L  N  W  V  K  Q  S
act gac tac acc ... ctg aac tgg gtg aag cag agc
G      Y      M  H      R  A
--c -g- --- tat ... a-- c-- --- cga --- gc-
----->
FR2 - IMGT
50      55      60
H  G  K  T  L  E  W  I  G  L  I  N  P  Y  N
cat gga aag acc ctt gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat
P      Q  G      M      W      N
-c- --- c-a ggg --- --g --- tgg --c --c --- a-- -g-
----->
- IMGT
65      70      75
G  G  T      T  Y  N  Q  K  F  K      G  K
ggg ggt act ... acc tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
N      A      Q      R
--- --c --a ... --a --t gca --- --t c- ... --g-
----->
FR3 - IMGT
80      85      90
A  T  L  T  V  D  K  S  S  S  T  A  Y  M  E
gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg gag
V      M      R      T      I
-t- --c a-g --c agg --- -c- --c at- ---
----->
95      100      105
L  L  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
S  R      R      D      T
--g ag- --g --- -g- --- --c --- a-g --c --g --- --g
----->
CDR3 - IMGT
110      115      120
R  E  E  I  T  K  D  F  D  F  W  G  Q  G  T
aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
--- --
----->
FR4 - IMGT
126
T  L  T  V  S  S
act ctc aca gtc tcc tca

```

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

227H1 VH  
X62106 IGHV1-2\*02

Fig.27A

```

      CDR3 - IMGT <-----
              110              115              120
      R   E   E   I   T   K   D   F   D   F   W   G   Q   G   T
227H1 VH  aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
              Y               Y
J00256 IGHJ4*01  ... .. -c t- - - -c -a- - - -a- - - -a- - -
              FR4 - IMGT ----->
                      126
      T   L   T   V   S   S
227H1 VH  act ctc aca gtc tcc tca
      L   V
J00256 IGHJ4*01  ctg g- - -c - - - - - g

```

**Fig.27B**

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)                                       | CDR1-IMGT<br>(27-38) | FR2-IMGT<br>(39-55)    | CDR2-IMGT<br>(56-65)  |
|------------------|----------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
|                  | 1            10            20                            | 30                   | 40            50       | 60                    |
| 227H1 VH         | EVQLQDSGP.ELVKPGASMKISCKAS                               | GYSFTDYT....         | LNWVKQSHGKLTLEWIGL     | INPYNGGT..            |
| Hàng             | 3    3    3    3    3    3                               |                      | 11   3   3   3   2   1 |                       |
| Vùng khung người | Q---V---A.-VK-----V-V-----                               |                      | MH--R-AP-QG---M-W      |                       |
| 227H1 HZVH       | QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCKAS                               | GYSFTDYT....         | LNWVRQAPGQGLEWMGL      | INPYNGGT..            |
|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                                     |                      | CDR3-IMGT<br>(105-115) | FR4-IMGT<br>(116-126) |
|                  | 70            80            90            100            |                      | 110                    | 120                   |
| 227H1 VH         | TYNQKFK.GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVIYC                  |                      | AREEITKDFDF            | WGQGTTLTVSS           |
| Hàng             | 1   3    3    3   2   1   1   3            3   3   3   3 |                      |                        | 33                    |
| Vùng khung người | N-A---Q.-RV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----                    |                      |                        | -----LV-----          |
| 227H1 HZVH       | TYAQKFQ.GRVMTVVDKSIISTAYMELSLRSDTAVIYC                   |                      | AREEITKDFDF            | WGQGTTLTVSS           |

**Fig.28**

[illegible]

**Fig.29A**

```

          CDR3 - IMGT _____ <----- FR4 - IMGT ----->
                110              115             120           123
          G   P   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K
VL 223C4    ggt cct cgg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag

V00777 IGKJ2*01      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - a - - -

```

**Fig.29B**

[illegible]

**Fig.30A**

```

                                CDR3 - IMGT _____ <----- FR4 - IMGT ----->
                                110                               115                               120                               123
                                G   P   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K
VI 223C4                      ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag
                                Q
J00242 IGTKJ2*01              - - - - -t -t -c ca- - - - - - - - - - -c - -

```

**Fig.30B**

|                |     |     |     |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|-----|-----|-----|----|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hz VL 223C4    | 1   | 5   | 10  | 15 | FR1 - IMGT |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | D   | I   | Q   | M  | T          | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | V |
| Hz VL 223C4    | 20  | 25  | 30  |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | G   | D   | R   | V  | T          | I | T | C | R | A | S | E | N | I | Y |
| Hz VL 223C4    | 35  | 40  | 45  |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | S   | N   |     |    |            |   |   |   | L | A | W | Y | Q | Q | K |
| Hz VL 223C4    | 50  | 55  | 60  |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Đột biến ngược | P   | G   | K   | A  | P          | K | L | L | L | Y | A | A | T |   |   |
|                | Q   |     |     | S  |            | Q |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | 3   |     |     | 2  |            | 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Hz VL 223C4    | 65  | 70  | 75  |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Đột biến ngược |     | R   | L   | E  | S          | G | V | P |   |   |   |   | S | R |   |
|                |     | N   |     | V  | D          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                |     | 1   |     | 1  | 2          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Hz VL 223C4    | 80  | 85  | 90  |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Đột biến ngược | F   | S   | G   | S  | G          |   | S | G | T | D | Y | T | L | T |   |
|                |     |     |     |    |            |   |   |   |   | Q |   |   |   |   |   |
|                |     |     |     |    |            |   |   |   |   | 2 |   |   |   |   |   |
| Hz VL 223C4    | 95  | 100 | 105 |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Đột biến ngược | I   | S   | S   | L  | Q          | P | E | D | F | A | T | Y | Y | C | Q |
|                | N   |     |     |    |            | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | 2   |     |     |    |            | 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Hz VL 223C4    | 110 | 115 | 120 |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | H   | F   | W   | G  | P          | P | Y | T | F | G | Q | G | T | K | L |
| Hz VL 223C4    | 123 |     |     |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                | E   | I   | K   |    |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

Fig.31

VH 223C4  
AC090843 IGHV1-18\*01

```

<-----FR1 - IMGT-----
1      5      10      15
E V L L Q Q S G P E L V K P
gag gtc ctg ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
Q
-a-----
----->
20      25      30
G A S V K I P C K A S G Y T F
ggg gct tca gtg aag ata ccc tgc aag gct tct gga tac aca ttc
-----

```

VH 223C4  
AC090843 IGHV1-18\*01

```

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T D Y N M D W V K Q S
act gac tac aac ... atg gac tgg gtg aag cag agc
-----

```

VH 223C4  
AC090843 IGHV1-18\*01

```

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
H G M S L E W I G D I N P N N
cat gga atg agc ctt gag tgg att gga gat att aat cct aac aat
K
-a-----

```

VH 223C4  
AC090843 IGHV1-18\*01

```

- IMGT <-----
65      70      75
G G T I F N Q K F K G K
ggt ggt act ... atc ttc aac cag aag ttc aag ... ggc aag
Y
-a-----

```

VH 223C4  
AC090843 IGHV1-18\*01

```

FR3 - IMGT -----
80      85      90
A T L T V D K S S S T A Y M E
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gag
-----

```

VH 223C4  
AC090843 IGHV1-18\*01

```

95      100      105
L R S L T S E D T A V Y Y C A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gac act gca gtc tat tac tgt gca
-----

```

Fig.32A

VH 223C4  
D13199 IGHD6-3\*01

```

CDR3 - IMGT
110      115
R G R Y V G Y Y Y A M D Y
aga ggg agg tat gtt ggt tac tac tat gct atg gac tac
D
... .tc -a-

```

Fig.32B

|                 |                                                                             |        |            |        |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------|------------|--------|
|                 | CDR3 - IMGT                                                                 | <----- | FR4 - IMGT | -----> |
|                 | 115                                                                         | 120    | 125        | 129    |
| VH 223C4        | G Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S                                       |        |            |        |
|                 | ggt tac tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca |        |            |        |
| V00770 IGHJ4*01 | -t                                                                          |        |            |        |

Fig.32C

|                   |                                                             |            |                     |      |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|------------|---------------------|------|
|                   |                                                             |            | FR1 - IMGT          |      |
|                   | 1                                                           | 5          | 10                  | 15   |
| VH 223C4          | E V L L Q Q S G P                                           |            | E L V K P           |      |
|                   | gag gtc ctg ctg caa cag tct gga cct ...                     |            | gag ctg gtg aag cct |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | Q Q V A V K                                                 |            |                     |      |
|                   | c-- -g -a- -gtg - - -g g- ... -g- aa- - -                   |            |                     |      |
|                   |                                                             | 20         | 25                  | 30   |
| VH 223C4          | G A S V K I P C K A S G Y T F                               |            |                     |      |
|                   | ggg gct tca gtg aag ata ccc tgc aag gct tct gga tac aca ttc |            |                     |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | - -c - - -g-c t- - - - - - - -c - -                         |            |                     |      |
|                   | CDR1 - IMGT                                                 | <-----     |                     |      |
|                   | 35                                                          | 40         | 45                  |      |
| VH 223C4          | T D Y N M D W V K Q S                                       |            |                     |      |
|                   | act gac tac aac ... .. atg gac tgg gtg aag cag agc          |            |                     |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | G Y H R A                                                   |            |                     |      |
|                   | -c -g- -t-t ... .. -c- - - -cga - -gc-                      |            |                     |      |
|                   |                                                             | FR2 - IMGT | ----->              | CDR2 |
|                   |                                                             | 50         | 55                  | 60   |
| VH 223C4          | H G M S L E W I G D I N P N N                               |            |                     |      |
|                   | cat gga atg agc ctt gag tgg att gga gat att aat cct aac aat |            |                     |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | P Q G M W S                                                 |            |                     |      |
|                   | -c- - -caa g-g - - - -g - -tgg -c -c - -g-                  |            |                     |      |
|                   | - IMGT                                                      | <-----     |                     |      |
|                   | 65                                                          | 70         | 75                  |      |
| VH 223C4          | G G T I F N Q K F K G K                                     |            |                     |      |
|                   | ggt ggt act ... .. atc ttc aac cag aag ttc aag ... ggc aag  |            |                     |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | - -c - -a ... .. -a- -at gca - - - -t c- ... -g-            |            |                     |      |
|                   |                                                             | FR3 - IMGT | ----->              |      |
|                   |                                                             | 80         | 85                  | 90   |
| VH 223C4          | A T L T V D K S S S T A Y M E                               |            |                     |      |
|                   | gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gag |            |                     |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | -t- -c a- -c agg - -c - -at- - - - - - - -                  |            |                     |      |
|                   |                                                             |            |                     |      |
|                   |                                                             | 95         | 100                 | 105  |
| VH 223C4          | L R S L T S E D T A V Y Y C A                               |            |                     |      |
|                   | ctc cgc agc ctg aca tct gag gac act gca gtc tat tac tgt gca |            |                     |      |
| X62106 IGHV1-2*02 | -g a- -g - -g - -c - -g -c -g - - - -g                      |            |                     |      |

Fig.33A

|                    | CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                    | 110         |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |
| VH 223C4           | R           | G   | R   | Y   | V   | G   | Y   | Y   | Y   | A   | M   | D   | Y   |
|                    | aga         | ggg | agg | tat | gtt | ggt | tac | tac | tat | gct | atg | gac | tac |
| X97051 IGHD1-26*01 | -t          | --- | --- | -c  | --- | -c  | tac |     |     |     |     |     |     |

Fig.33B

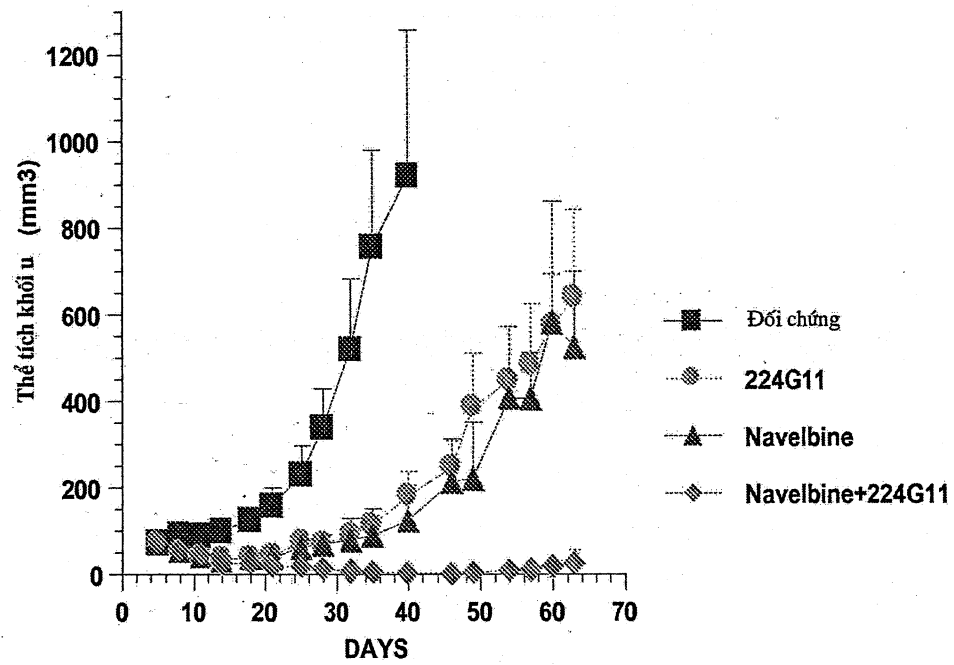
|                | CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <----- FR4 - IMGT |     |     |     |     |     |
|----------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                | 110         |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120               |     |     |     | 125 |     |
| VH 223C4       | R           | Y   | V   | G   | Y   | Y   | Y   | A   | M   | D   | Y   | W   | G                 | Q   | G   | T   | S   | V   |
|                | agg         | tat | gtt | ggt | tac | tac | tat | gct | atg | gac | tac | tgg | ggt               | caa | gga | acc | tca | gtc |
|                |             |     | Y   | Y   |     |     |     | G   |     |     | V   |     |                   |     |     |     | T   |     |
| J00256 IGJ6*01 | --          | tac | tac | --- | --- | --- | --- | -c  | -g- | --- | gt- | --- | -g                | --- | -g  | --- | a-g | --- |
|                | ----->      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |
|                |             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |
|                |             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |
| VH 223C4       | T           | V   | S   | S   |     |     |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |
|                | acc         | gtc | tac | tca |     |     |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |
| J00256 IGJ6*01 | ---         | --- | --- | --- |     |     |     |     |     |     |     |     |                   |     |     |     |     |     |

Fig.33C



|                               |                         |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|-------------------------------|-------------------------|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR1 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               | 1                       |   |   | 5   |   |   |   | 10  |   |   |   |   | 15  |   |   |
|                               | Q                       | V | Q | L   | V | Q | S | G   | A |   | E | V | K   | K | 2 |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR2 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               | 2                       |   | 2 | 2   |   |   |   | 3   |   |   |   |   | 3   |   |   |
|                               | E                       |   | L | Q   |   |   |   | P   |   |   |   |   | V   |   |   |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR3 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 23  |   |   |   | 25  |   |   |   |   | 30  |   |   |
|                               | G                       | A | S | V   | K | V | S | C   | K | A | S | G | Y   | T | P |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR4 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 35  |   |   |   | 40  |   |   |   |   | 45  |   |   |
|                               | T                       | D | Y | N   |   |   |   | M   | H | W | V | R | Q   | A |   |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR5 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 50  |   |   |   | 55  |   |   |   |   | 60  |   |   |
|                               | P                       | G | Q | G   | L | E | W | M   | S | W | I | N | P   | K | K |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR6 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 65  |   |   |   | 70  |   |   |   |   | 75  |   |   |
|                               | G                       | G | T |     |   | N | Y | A   | Q | K | F | Q |     | G | R |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR7 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 80  |   |   |   | 85  |   |   |   |   | 90  |   |   |
|                               | V                       | T | M | T   | R | D | T | S   | I | S | C | A | Y   | M | E |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR8 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 95  |   |   |   | 100 |   |   |   |   | 105 |   |   |
|                               | L                       | S | R | L   | R | S | D | D   | T | A | V | Y | Y   | C | A |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR9 - IMGT----->  |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 110 |   |   |   | 115 |   |   |   |   | 120 |   |   |
|                               | R                       | G | R | Y   | V | G | Y | Y   | Y | A | M | E | Y   | W | G |
| Hz VH 223C4<br>Đột biến ngược | <-----FR10 - IMGT-----> |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |
|                               |                         |   |   | 125 |   |   |   | 129 |   |   |   |   |     |   |   |
|                               | Q                       | G | T | T   | V | T | V | S   | S |   |   |   |     |   |   |

Fig.34

**Fig.35**

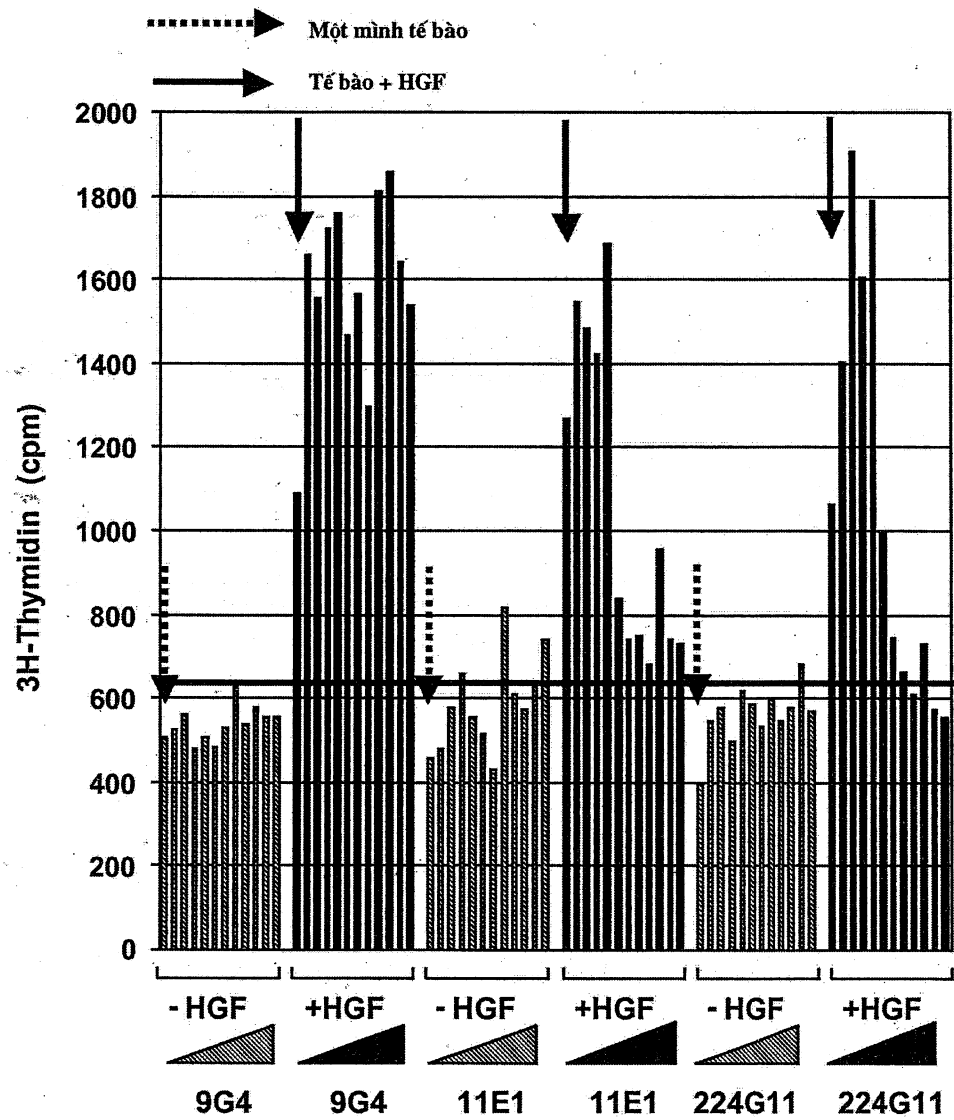
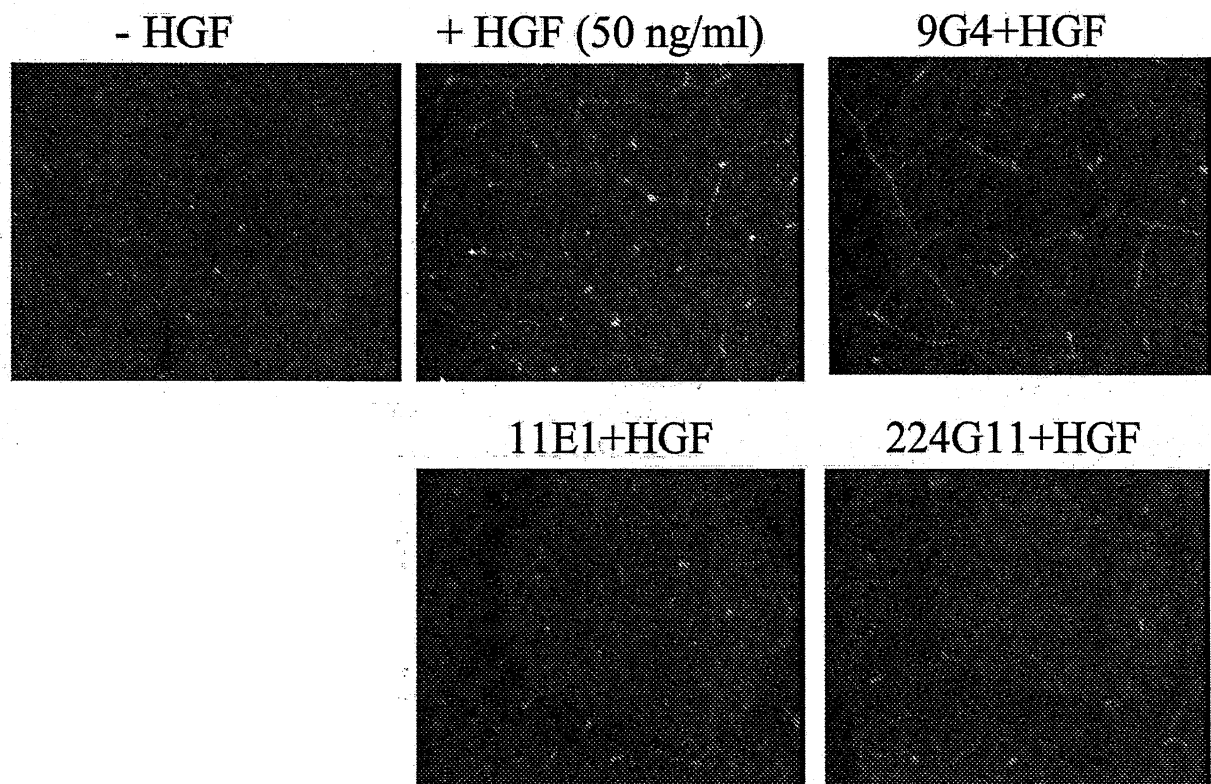


Fig.36

**Fig.37**

```

11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
FR1 - IMGT
1      5      10      15
Q I V L T Q S P A I M S A S P
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
20      25      30
G E K V T L T C S A S S S V S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
CDR1 - IMGT
35      40      45
S T Y L Y W Y Q Q K
tcc acc tac ... .. ttg tac tgg tac cag cag aag
S
-g- ... ..
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
FR2 - IMGT
50      55      60
P G S S P K L W I Y T T S
cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc ... ..
S
-g- ... ..
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
- IMGT
65      70      75
I L A S G V P A R
... .. atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
N
-a- ... ..
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
FR3 - IMGT
80      85      90
F S G S G S G T S Y S L T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct ggg acc tct tac tct ctc aca
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
95      100      105
I S S M E T E D A A S Y F C H
atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
A
g- ... ..
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
CDR3 - IMGT
110      115      120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg
P
cc- c
-----
11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01
-----
123
D I K
gac ata aaa

```

Fig.38A

```

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT
110 115 120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

V00777 IGKJ4*01
----->
123
D I K
gac ata aaa
E
--a --- --- c

```

**Fig.38B**

```

11E1 VL
X72820 IGKV3D-7*01
<----- FR1 - IMGT -----
1      5      10      15
Q I V L T Q S P A I M S A S P
caa att gtt ctg acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
E      M      T L      L
g-- --a a-g --a --c --c c-- --a --a
----->
      20      25      30
G E K V T L T C S A S S V S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
      R A      S      R      Q
--a --ga --c-- c-c t-- --g --t cag --t --c
----->
CDR1 - IMGT <-----
      35      40      45
S T Y      L Y W Y Q Q K
tcc acc tac ... .. ttg tac tgg tac cag cag aag
      S      S
ag- -g- --a --c-- --a
----->
FR2 - IMGT ----- CDR2
      50      55      60
P G S S P K L W I Y T T S
cca gga tcc tcc ccc aaa ctg tgg att tat acc aca tcc ...
      Q A      R      L      G A
--t --g cag g-t --gg --c --c --g g- --a --a
----->
- IMGT <-----
      65      70      75
I L A S G V P A R
... .. atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
      T R      T I
... .. -c ag- --c a-- --c a-- --a ... --c a-g
----->
FR3 - IMGT -----
      80      85      90
F S G S G      S G T S Y S L T
ttc agt gcc agt ggg ... tct ggg acc tct tac tct ctc aca
      D F T
--a --a --a --a --a --a --a --a --a --a --a --a
----->
      95      100      105
I S S M E T E D A A S Y F C H
atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
      L Q P      F V Y Q
--c --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c
----->
CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT -----
      110      115      120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc gcc tgg ggg aca aag ttg
      D Y N L
--g gat ta- -ac -ta --t cc
----->
      123
D I K
gac ata aaa

```

Fig.39A

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->  
 110 115 120 123  
 Y P F T F G S G T K L D I K  
 tac cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gac ata aaa  
 G V E  
 AF103571 IGKJ4\*02 .....g c----- gga ---c---g-g-c---

Fig.39B

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)         | CDR1-IMGT<br>(27-38) | FR2-IMGT<br>(39-55) | CDR2-IMGT<br>(56-65) |
|------------------|----------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 11E1 VL          | 1 10 20                    | 30                   | 40 50               | 60                   |
| Hàng             | ..... ..... .....          | ..... .....          | ..... .....         | ..... .....          |
| Vùng khung người | QIVLTQSPAIMSASPGEKVITCSAS  | SSVSSTY.....         | LYWYQQKPGSSPKLWIY   | TTS.....             |
| 11E1 HZVL        | 3 1 33 3 33 3 2            | 1 33 3 2             | 1 33 3 2            |                      |
|                  | E--M-----TL-L---RA--S-R--  |                      | -S-----QA-R-L--     |                      |
|                  | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS | SSVSSTY.....         | LYWYQQKPGQAPRLLIY   | TTS.....             |

|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                     | CDR3-IMGT<br>(105-113) | FR4-IMGT<br>(114-123) |
|------------------|------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 11E1 VL          | 70 80 90 100                             | 110                    | 120                   |
| Hàng             | ..... ..... ..... .....                  | ..... ....             | ..... ....            |
| Vùng khung người | ILASGVP.ARFSGSG..SGTSYSLTISSMETEDAASYFC  | HQWSSYPFT              | FGSGTKLDIK            |
| 11E1 HZVL        | 22 3 3 213 321 2 3 3                     |                        | 3 32                  |
|                  | TR-T-I-.....DFT-----LQP--F-V-Y-          | HQWSSYPFT              | --G---VE--            |
|                  | TRATGIP.ARFSGSG..SGTDYTLTISSLQTEDEFAVYYC |                        |                       |

Fig.40



```

11E1 VH
AC090843 IGHV1-7*01
<----- FRI - IMGT
1      5      10      15
Q V Q L Q Q S G A E L A K P
cag gtc cag ctt cag cag tct ggg gct ... gaa ctg gca aaa cct
-----g-----

----->
20      25      30
G A S V K M S C K A S G Y T F
ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttt
L
-----c-----

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T S Y W M N W V K Q R
act tcc tac tgg ... atg aac tgg gtg aaa cag agg
H
ag- - - - - c- - - - a- - - -

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P G Q G L E W I G Y I N P T T
cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aac cct acc act
S S
-----t-----g-----g-----

- IMGT <-----
65      70      75
G S T D Y N Q K L K D K
ggt tct act ... gac tac aat cag aag tta aag ... gac aag
Y K F
-a- - - - - a-g - - - - - c- - - -

FR3 - IMGT ----->
80      85      90
A T L T A D K S S N T A Y M Q
gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa
S
-----g-----g-----

----->
95      100      105
L S S L T S E D S A V Y Y C A
ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
Y
-----a-----

CDR3 - IMGT <-----
110      115      120
I G G Y G S W F A Y W G Q G T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act
R
-g-

FR4 - IMGT ----->
126
L V T V S A
ctg gtc act gtc tct gca

```

Fig.41A

11E1 VH  
L32868 IGHD4-1\*01

| CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 105         |     |     |     |     | 110 |     |     |     | 115 |
| A           | I   | G   | G   | Y   | G   | S   | W   | F   | A   |
| gca         | ata | gga | gga | tat | ggg | tcc | tgg | ttt | gct |
|             | -g  | --- |     | c   |     |     |     |     |     |

Fig.41B

11E1 VH  
V00770 IGHJ3\*01

| CDR3 - IMGT |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <----- |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
|             |     |     |     |     | 110 |     |     |     | 115 |        |     |     | 120 |
| I           | G   | G   | Y   | G   | S   | W   | F   | A   | Y   | W      | G   | Q   | G   |
| ata         | gga | gga | tat | ggg | tcc | tgg | ttt | gct | tac | tgg    | ggc | caa | ggg |
| ...         | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ...    | ... | ... | ... |

FR4 - IMGT ----->

|     |     |     |     |     | 126 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| L   | V   | T   | V   | S   | A   |
| ctg | gtc | act | gtc | tct | gca |
| --- | --- | --- | --- | --- | g   |

11E1 VH  
V00770 IGHJ3\*01

Fig.41C

[illegible]

**Fig.42A**

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->  
 110 115 120 126  
 G S W F A Y W G Q G T L V T V S A  
 ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca  
 S  
 11E1 VH  
 M25625 IGHJ4\*03 ... .g- -ac --- -ac --- --- --- -c --- -c t-- g

Fig.42B

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)        | CDR1-IMGT<br>(27-38) | FR2-IMGT<br>(39-55) | CDR2-IMGT<br>(56-65) |
|------------------|---------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 11E1 VH          | 1 10 20 30 40 50 60       |                      |                     |                      |
| Hàng             | 3 33 3                    |                      | 1 3 3 2 1           |                      |
| Vùng khung người | ---V--- -VK-----V-----    |                      | -H--R-A-----M-I     |                      |
| 11E1 HZVH        | QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS | GYTFTSYW....         | MNWRQAPGQGLEWMGY    | INPTTGST..           |

|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                     | CDR3-IMGT<br>(105-115) | FR4-IMGT<br>(116-126) |
|------------------|------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 11E1 VH          | 70 80 90 100 110 120                     |                        |                       |
| Hàng             | 1 23 332 2 1 1 33 2 3 3 3                |                        | 3                     |
| Vùng khung người | S-A--FQ.GRV-M-R-T-TS-V--E---R---T-----   |                        | -----S                |
| 11E1 HZVH        | DYAQKFQ.GRVTMTADKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYC | AIGGYGSWFAY            | WGQGTLLVTVSS          |

Fig.43

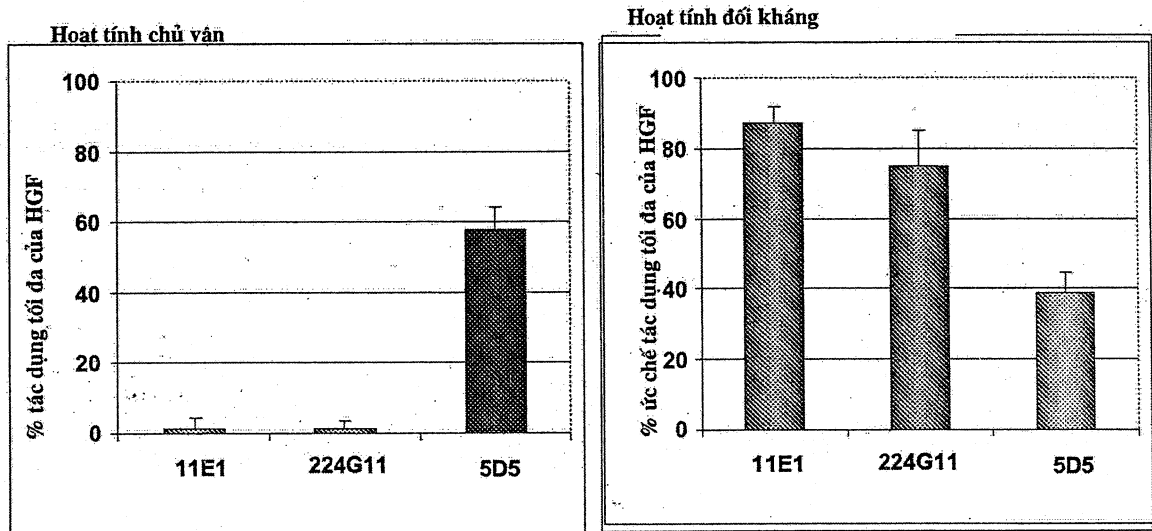


Fig.44A

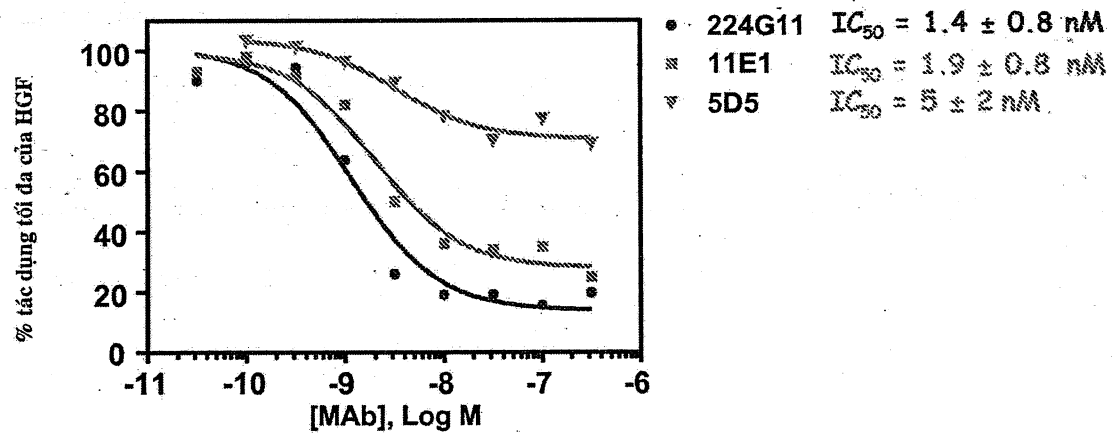


Fig.44B

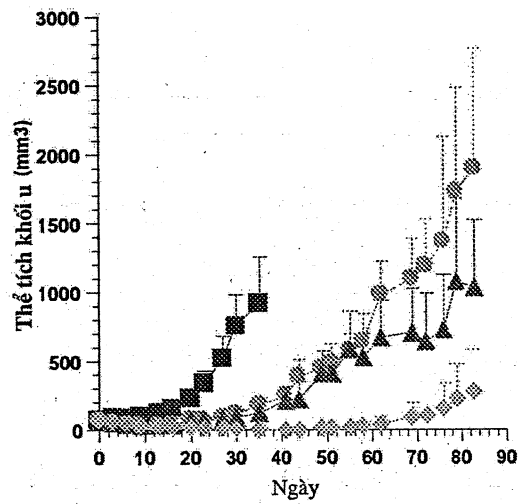


Fig.45

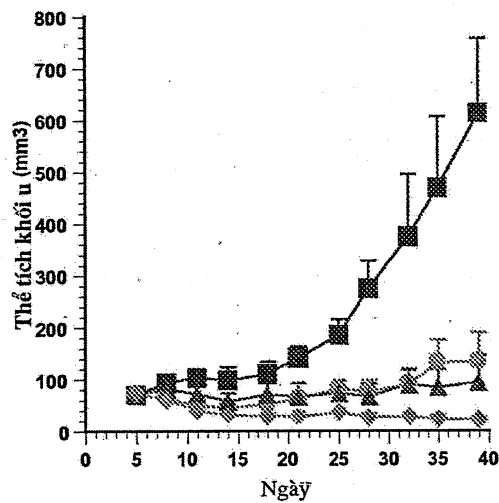


Fig.46

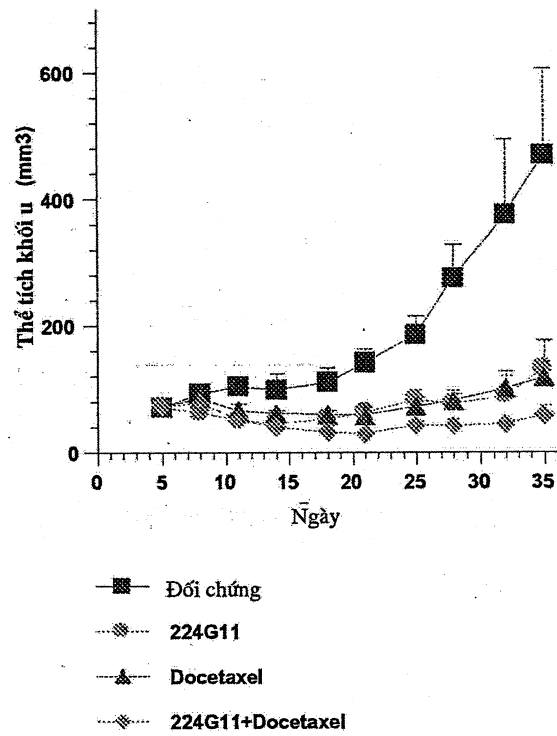


Fig.47

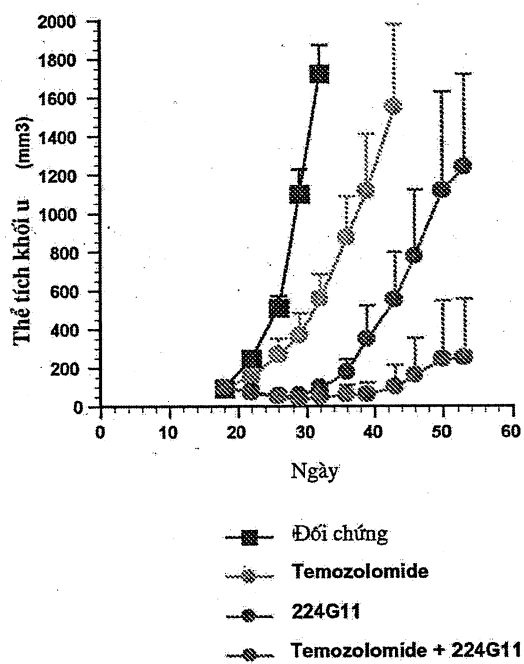
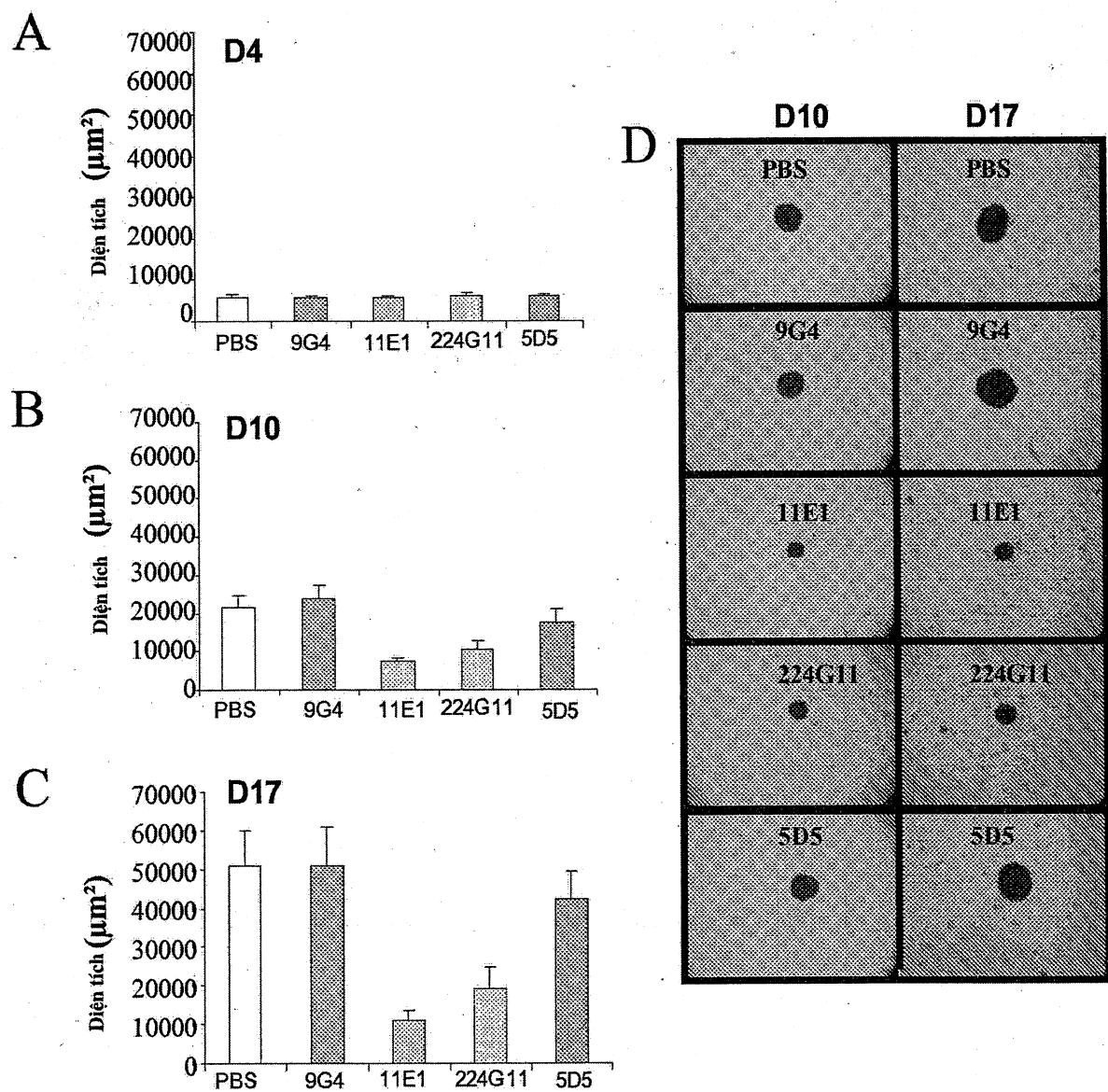
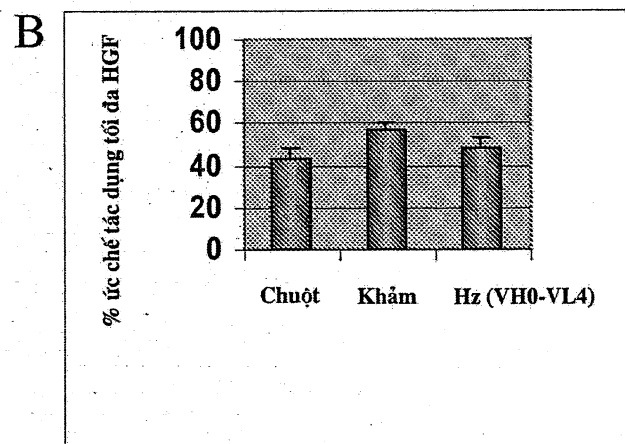
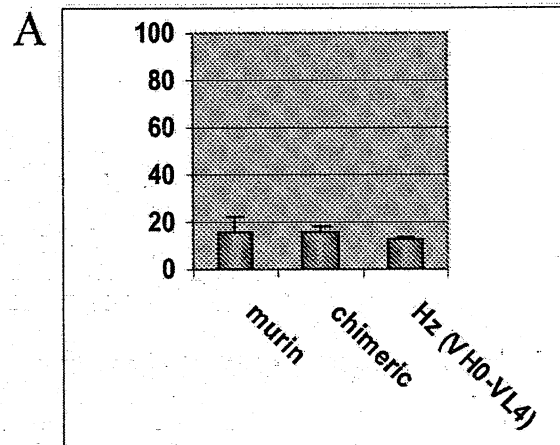


Fig.48



**Fig.49A - Fig.49B - Fig.49C - Fig.49D**





**Fig.50A - Fig.50B**

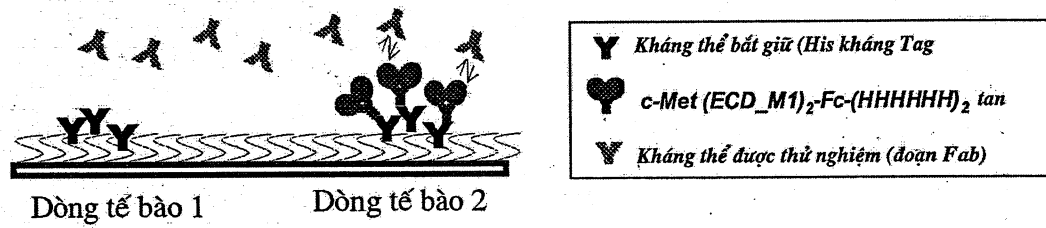


Fig.51

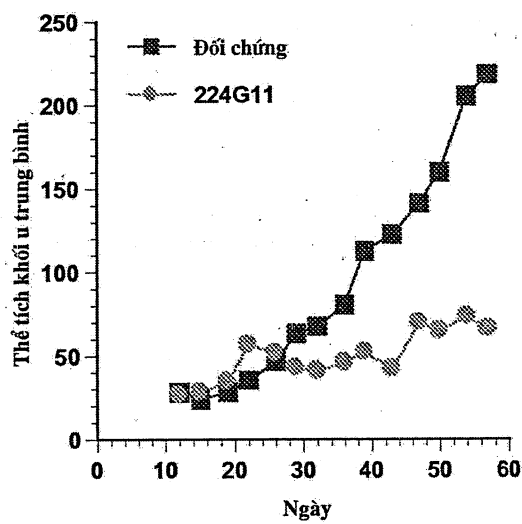


Fig.52

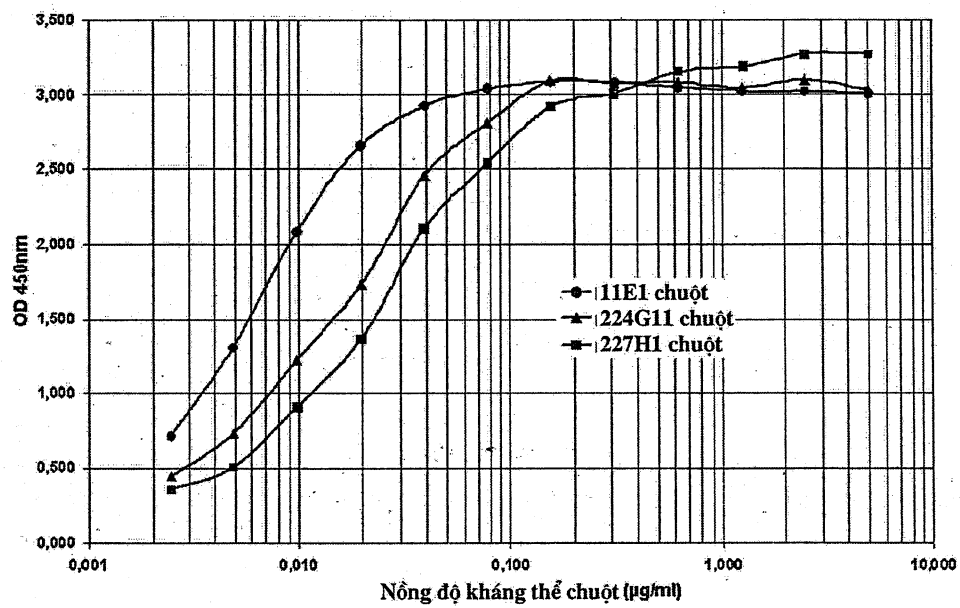


Fig.53

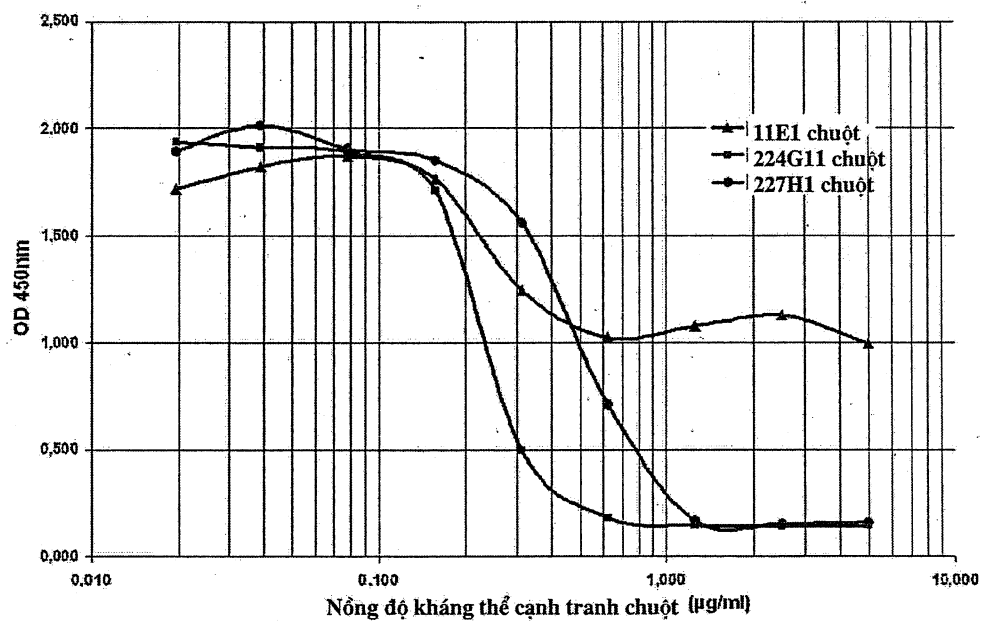


Fig.54

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)          | CDR1-IMGT<br>(27-38) | FR2-IMGT<br>(39-55) | CDR2-IMGT<br>(56-65) |
|------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                  | 1 10 20 30 40 50 60         |                      |                     |                      |
| 227H1 VH         | EVQLQQSGP.ELVKPGASMKISCKAS  | GYSFTDYT....         | LNWVKQSHGKTLEWIGL   | INPYNGGT..           |
| Vùng khung người | Q---V---A.-VK-----V-V-----  |                      | MH--R-AP-QG---M-W   |                      |
| Thay đổi ở       | * * 2 *2 3 *                |                      | 11 * 33 22 2 1      |                      |
| 227H1 HZ3VH      | QVQLVQSGP.EVVKPGASMKVSCCKAS | GYSFTDYT....         | LNWVRQSHGKTLEWIGL   | INPYNGGT..           |
| 227H1 HZ2VH      | QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS | GYSFTDYT....         | LNWVRQAPGKTLEWIGL   | INPYNGGT..           |
| 227H1 HZ1VH      | QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS | GYSFTDYT....         | LNWVRQAPQGGLWMMGL   | INPYNGGT..           |

|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                    | CDR3-IMGT<br>(105-115) | FR4-IMGT<br>(116-126) |
|------------------|-----------------------------------------|------------------------|-----------------------|
|                  | 70 80 90 100 110 120                    |                        |                       |
| 227H1 VH         | TYNQKFK.GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC | AREEITKDFDF            | WGQGTTLTVSS           |
| Vùng khung người | N-A---Q.-RV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----   |                        | -----LV-----          |
| Thay đổi ở       | 1 * 3 *2 2 1 1 3 ** 3 3 *               |                        | 22                    |
| 227H1 HZ3VH      | TYAQKFK.GRATLTVDKSSSTAYMELSRLTSEDTAVYYC | AREEITKDFDF            | WGQGTTLTVSS           |
| 227H1 HZ2VH      | TYAQKFQ.GRATLTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC  | AREEITKDFDF            | WGQGTTLTVSS           |
| 227H1 HZ1VH      | TYAQKFQ.GRVMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC   | AREEITKDFDF            | WGQGTTLTVSS           |

Fig.55

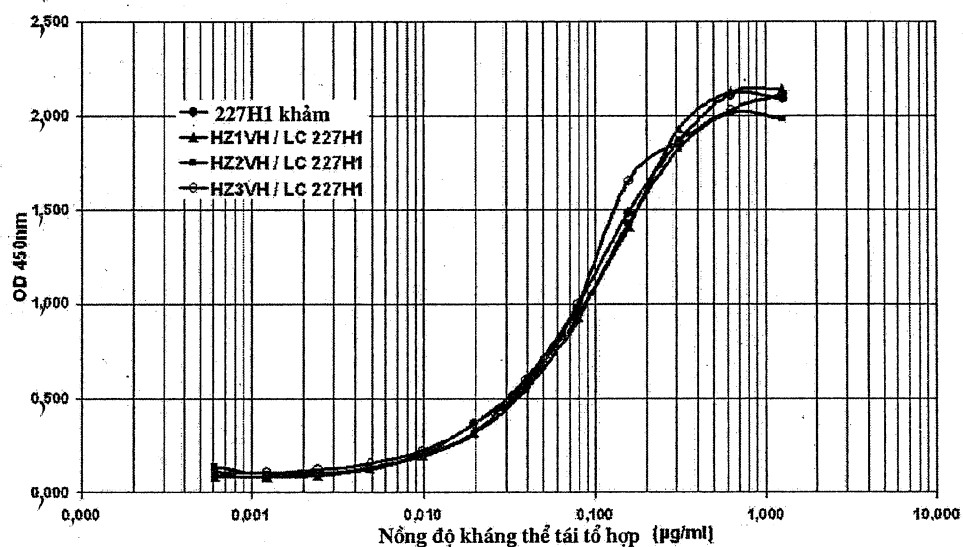


Fig.56

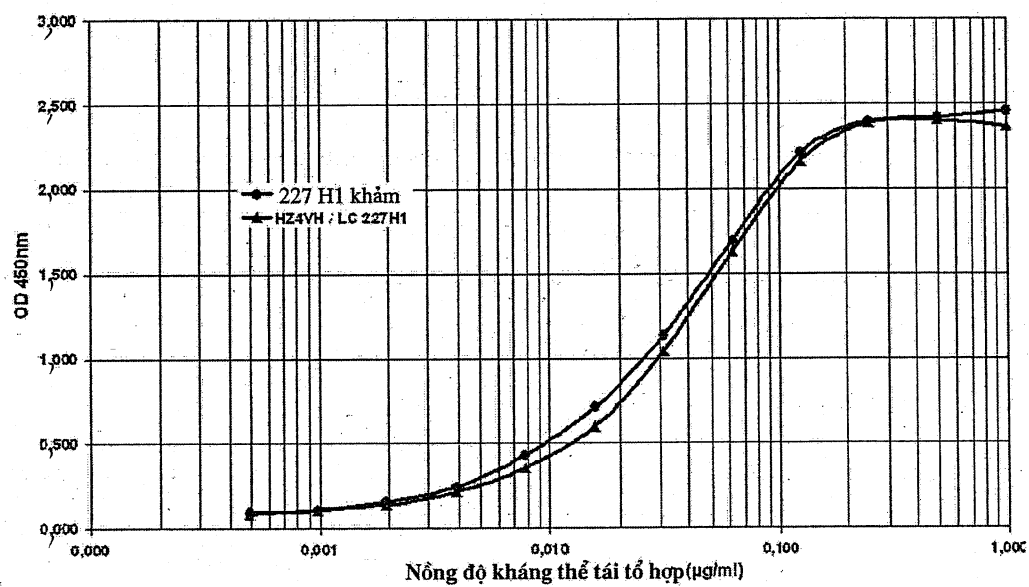


Fig.57

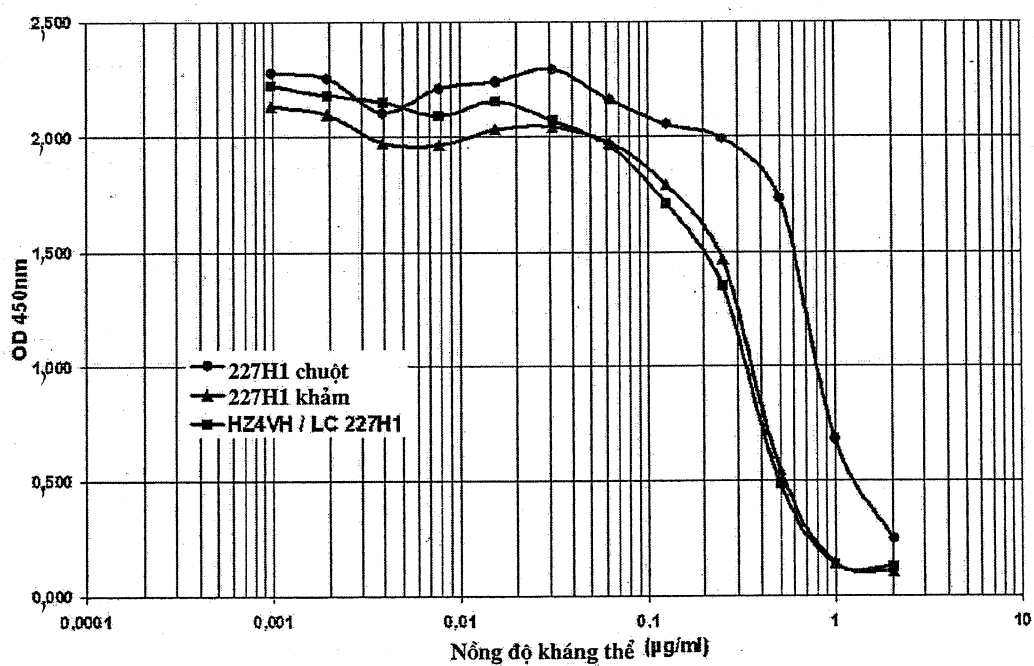


Fig.58

|                      | FR1-IMGT<br>(1-26)        |                   |    |                   | CDR1-IMGT<br>(27-38) |                   |     |                   | FR2-IMGT<br>(39-55) |                   |     |                   | CDR2-IMGT<br>(56-65) |                   |  |                   |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
|----------------------|---------------------------|-------------------|----|-------------------|----------------------|-------------------|-----|-------------------|---------------------|-------------------|-----|-------------------|----------------------|-------------------|--|-------------------|------------------------|--|--|--|-----------------------|--|--|--|
|                      | 1                         |                   | 10 |                   | 20                   |                   | 30  |                   | 40                  |                   | 50  |                   | 60                   |                   |  |                   |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
| 227H1-HZ VH          | ..... ..... .....         | ..... ..... ..... |    | ..... ..... ..... |                      | ..... ..... ..... |     | ..... ..... ..... |                     | ..... ..... ..... |     | ..... ..... ..... |                      |                   |  |                   |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
| 227H1-HZ VH          | QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS |                   |    |                   | GYSFTDYT....         |                   |     |                   | MHWVRQAPQGQGLEWMGW  |                   |     |                   | INPYNGGT..           |                   |  |                   |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
| được làm giống người | * * ! *!                  |                   |    |                   | ! *                  |                   |     |                   | SS * !!!            |                   |     |                   | ! \$                 |                   |  |                   |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
|                      |                           |                   |    |                   |                      |                   |     |                   |                     |                   |     |                   | FR3-IMGT<br>(66-104) |                   |  |                   | CDR3-IMGT<br>(105-115) |  |  |  | FR4-IMGT<br>(116-126) |  |  |  |
|                      | 70                        |                   | 80 |                   | 90                   |                   | 100 |                   | 110                 |                   | 120 |                   |                      |                   |  |                   |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
| 227H1-HZ VH          | ..... ..... .....         | ..... ..... ..... |    | ..... ..... ..... |                      | ..... ..... ..... |     | ..... ..... ..... |                     | ..... ..... ..... |     | ..... ..... ..... |                      | ..... ..... ..... |  | ..... ..... ..... |                        |  |  |  |                       |  |  |  |
| 227H1-HZ VH          | NYAQKFQ.GRVTMT            |                   |    |                   | RDTSISTAYMEL         |                   |     |                   | SRLRSDDTAVYYC       |                   |     |                   | AREEITKDFDF          |                   |  |                   | WGQGLTVTVSS            |  |  |  |                       |  |  |  |
| được làm giống người | \$ * !                    |                   |    |                   | *! ! \$ \$ !         |                   |     |                   | ** ! ! *            |                   |     |                   |                      |                   |  |                   | !!                     |  |  |  |                       |  |  |  |

Fig.59

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)   |                   |          |        | CDR1-IMGT<br>(27-38)   |      |  |  | FR2-IMGT<br>(39-55)   |           |  |              | CDR2-IMGT<br>(56-65) |    |  |  |
|------------------|----------------------|-------------------|----------|--------|------------------------|------|--|--|-----------------------|-----------|--|--------------|----------------------|----|--|--|
|                  | 1                    | 10                | 20       |        | 30                     |      |  |  | 40                    | 50        |  |              | 60                   |    |  |  |
| 11E1 VH          | QVQLQSGA             | ELAKPGAS          | VKMSCKAS |        | GYTFTSYW               | .... |  |  | MNWRQAP               | QGQLEWIGY |  |              | INPTTGST             | .. |  |  |
| Vùng khung người | -----V-----          | -VK-----          | V-----   |        |                        |      |  |  | -H--R-A-----          | M-I       |  |              |                      |    |  |  |
| Thay đổi ở       | *                    | **                | 3        |        |                        |      |  |  | 1 * *                 | 2 1       |  |              |                      |    |  |  |
| 11E1 HZ VH3      | QVQLVQSGA            | EVKKPGAS          | VKMSCKAS |        | GYTFTSYW               | .... |  |  | MNWRQAP               | QGQLEWIGY |  |              | INPTTGST             | .. |  |  |
| 11E1 HZ VH2      | QVQLVQSGA            | EVKKPGAS          | VKVSCKAS |        | GYTFTSYW               | .... |  |  | MNWRQAP               | QGQLEWIGY |  |              | INPTTGST             | .. |  |  |
| 11E1 HZ VH1      | QVQLVQSGA            | EVKKPGAS          | VKVSCKAS |        | GYTFTSYW               | .... |  |  | MNWRQAP               | QGQLEWMGY |  |              | INPTTGST             | .. |  |  |
|                  | FR3-IMGT<br>(66-104) |                   |          |        | CDR3-IMGT<br>(105-115) |      |  |  | FR4-IMGT<br>(116-126) |           |  |              |                      |    |  |  |
|                  | 70                   | 80                | 90       | 100    | 110                    |      |  |  | 120                   |           |  |              |                      |    |  |  |
| 11E1 VH          | DYNQKLK              | DKATLTADKSSNT     | AYMQLSSL | TSEDS  | SAVYYC                 |      |  |  | AIGGYGSWFAY           |           |  | WGQGLTVTVSSA |                      |    |  |  |
| Vùng khung người | S-A--FQ              | GRV-M-R-T-TS-V--E | ----     | R----- | T-----                 |      |  |  |                       |           |  | -----S       |                      |    |  |  |
| Thay đổi ở       | 1 3                  | 23 3 2 2 1 1      | 33 2     | 3      | *                      |      |  |  |                       |           |  | *            |                      |    |  |  |
| 11E1 HZ VH3      | DYNQKLK              | DRATLTADKSSNT     | AYMELSSL | TSEDT  | AVYYC                  |      |  |  | AIGGYGSWFAY           |           |  | WGQGLTVTVSS  |                      |    |  |  |
| 11E1 HZ VH2      | DYAKLQ               | GRATLTADKSTST     | AYMELSSL | RSEDT  | AVYYC                  |      |  |  | AIGGYGSWFAY           |           |  | WGQGLTVTVSS  |                      |    |  |  |
| 11E1 HZ VH1      | DYAKLQ               | GRVTMTADKSTST     | VYMESSL  | RSEDT  | AVYYC                  |      |  |  | AIGGYGSWFAY           |           |  | WGQGLTVTVSS  |                      |    |  |  |

Fig.60

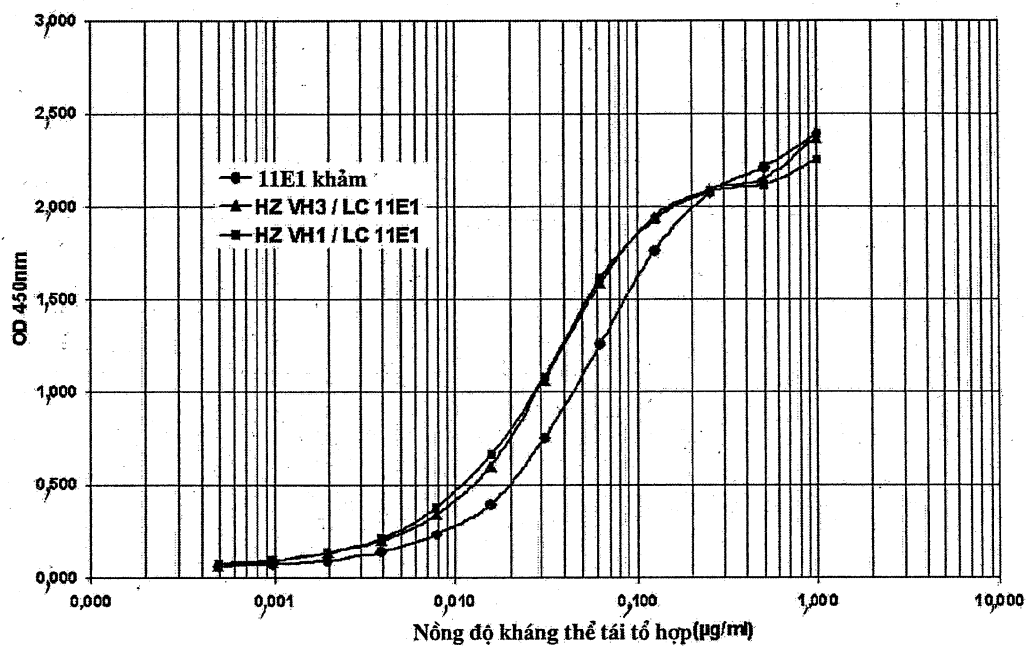


Fig.61

|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)          |              |                   | CDR1-IMGT<br>(27-38) |               | FR2-IMGT<br>(39-55) |    | CDR2-IMGT<br>(56-65) |  |
|------------------|-----------------------------|--------------|-------------------|----------------------|---------------|---------------------|----|----------------------|--|
|                  | 1                           | 10           | 20                | 30                   | 40            | 50                  | 60 |                      |  |
| 11E1 VL          | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSAS  | SSVSSTY..... | LYWYQQKPGSSPKLWIY | TTS.....             |               |                     |    |                      |  |
| Vùng khung người | E--M-----TL-L-----RA--S-R-- |              |                   |                      |               |                     |    |                      |  |
| Thay đổi ở       | * 1      *3 *      ** * 2   |              |                   |                      | 1      33 * 2 |                     |    |                      |  |
| 11E1 HZ VL3      | EIVLTQSPATMSLSPGERATLSCSAS  | SSVSSTY..... | LYWYQQKPGSSPRLWIY | TTS.....             |               |                     |    |                      |  |
| 11E1 HZ VL2      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSAS  | SSVSSTY..... | LYWYQQKPGQAPRLWIY | TTS.....             |               |                     |    |                      |  |
| 11E1 HZ VL1      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS  | SSVSSTY..... | LYWYQQKPGQAPRLLIY | TTS.....             |               |                     |    |                      |  |

|                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                      |           |            |     | CDR3-IMGT<br>(105-113) |     | FR4-IMGT<br>(114-123) |  |
|------------------|-------------------------------------------|-----------|------------|-----|------------------------|-----|-----------------------|--|
|                  | 70                                        | 80        | 90         | 100 | 110                    | 120 |                       |  |
| 11E1 VL          | ILASGVP..ARFSGSG..SGTSYSLTISSMETEDAASYFC  | HQWSSYPFT | FGSGTKVDIK |     |                        |     |                       |  |
| Vùng khung người | TR-T-I-.....DFT-----LQP--F-V-Y-           |           |            |     |                        |     |                       |  |
| Thay đổi ở       | 22 * *      213      321      2 3 3       |           |            |     |                        |     |                       |  |
| 11E1 HZ VL3      | ILATGIP..ARFSGSG..SGTSYSLTISSMETEDAASYFC  | HQWSSYPFT | FGSGTKVDIK |     |                        |     |                       |  |
| 11E1 HZ VL2      | ILATGIP..ARFSGSG..SGTSYTLTISSLETEDAAYVYC  | HQWSSYPFT | FGGGTKVDIK |     |                        |     |                       |  |
| 11E1 HZ VL1      | TRATGIP..ARFSGSG..SGTDYTLTISSLQTEDEFAVYYC | HQWSSYPFT | FGGGTKVEIK |     |                        |     |                       |  |

Fig.62

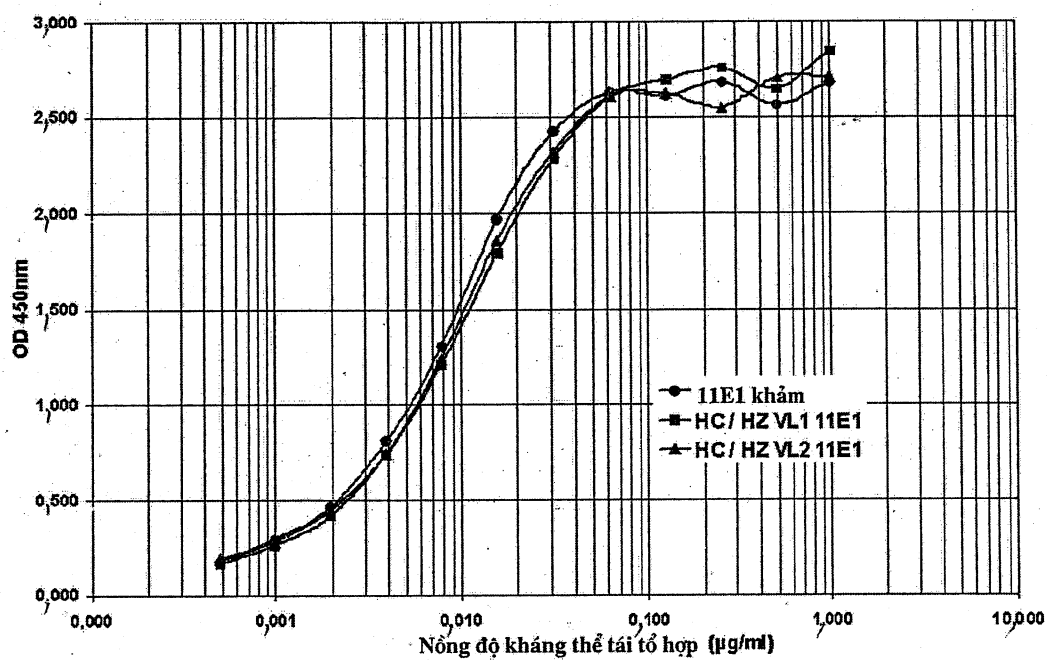


Fig.63

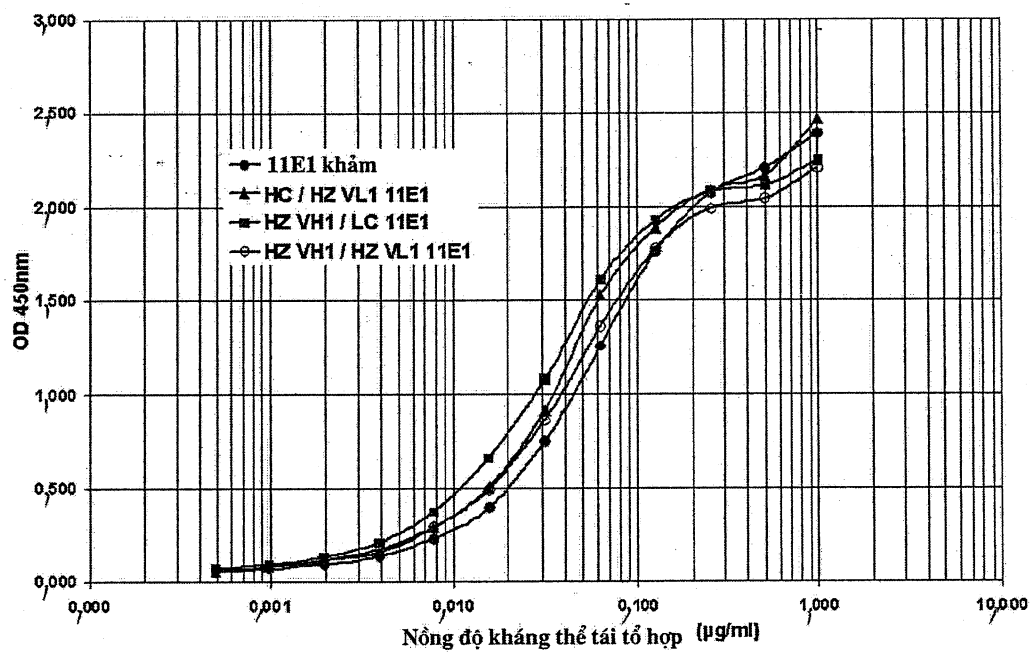


Fig.64



|                  | FR1-IMGT<br>(1-26)   |                                 |                | CDR1-IMGT<br>(27-38)   |             |          | FR2-IMGT<br>(39-55)   |  |  | CDR2-IMGT<br>(56-65) |  |  |
|------------------|----------------------|---------------------------------|----------------|------------------------|-------------|----------|-----------------------|--|--|----------------------|--|--|
|                  | 1                    | 10                              | 20             | 30                     | 40          | 50       | 60                    |  |  |                      |  |  |
| 224G11 VH        | EVQLQQSGP            | ELVKPGASVKISCKTS                | GYIFTAYT       | MHWVRQSLGESLDWIGG      | IKPNNGLA..  |          |                       |  |  |                      |  |  |
| 227H1 VH         | EVQLQQSGP            | ELVKPGASVKISCKAS                | GYIFTAYT       | LNWVKQSHGKTLEWIGL      | INPYNGGT..  |          |                       |  |  |                      |  |  |
| Vùng khung người | Q---V---A            | -VK-----V---A-                  |                |                        |             |          |                       |  |  |                      |  |  |
| 224G11 HZ VH0    | QVQLVQSGA            | EVKKPGASVKVSCAS                 | GYIFTAYT       | MHWVRQAPGQGLEWMGW      | IKPNNGLA..  |          |                       |  |  |                      |  |  |
|                  | FR3-IMGT<br>(66-104) |                                 |                | CDR3-IMGT<br>(105-115) |             |          | FR4-IMGT<br>(116-126) |  |  |                      |  |  |
|                  | 70                   | 80                              | 90             | 100                    | 110         | 120      |                       |  |  |                      |  |  |
| 224G11 VH        | NYNQKFK              | GKATLTVDKSSSTAYMDLRS            | LTSEDSAVYYC    | ARSEITTEFDY            | WGQGTALT    | VSS      |                       |  |  |                      |  |  |
| 227H1 VH         | TYNQKFK              | GKATLTVDKSSSTAYMELLS            | LTSEDSAVYYC    | AREEITKDFD             | WGQGTTLT    | VSS      |                       |  |  |                      |  |  |
| Vùng khung người | --A---Q              | -RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T----- |                |                        |             |          |                       |  |  |                      |  |  |
| 224G11 HZ VH0    | NYAQKFQ              | GRVTMT                          | RDTSISTAYMELSR | LSDDTAVYYC             | ARSEITTEFDY | WGQGTTLT | VSS                   |  |  |                      |  |  |

Fig.65

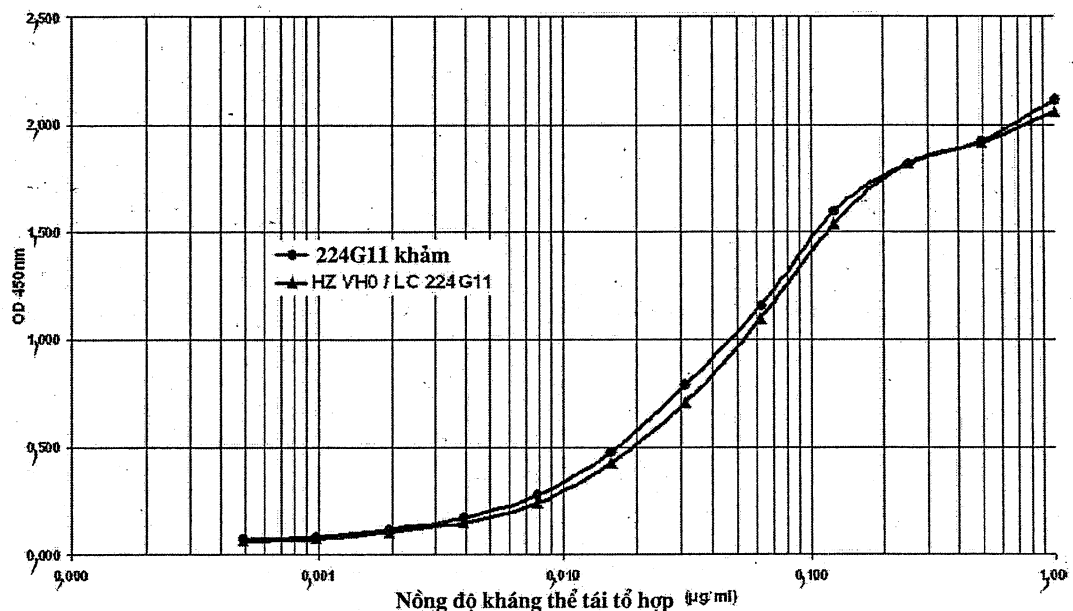


Fig.66

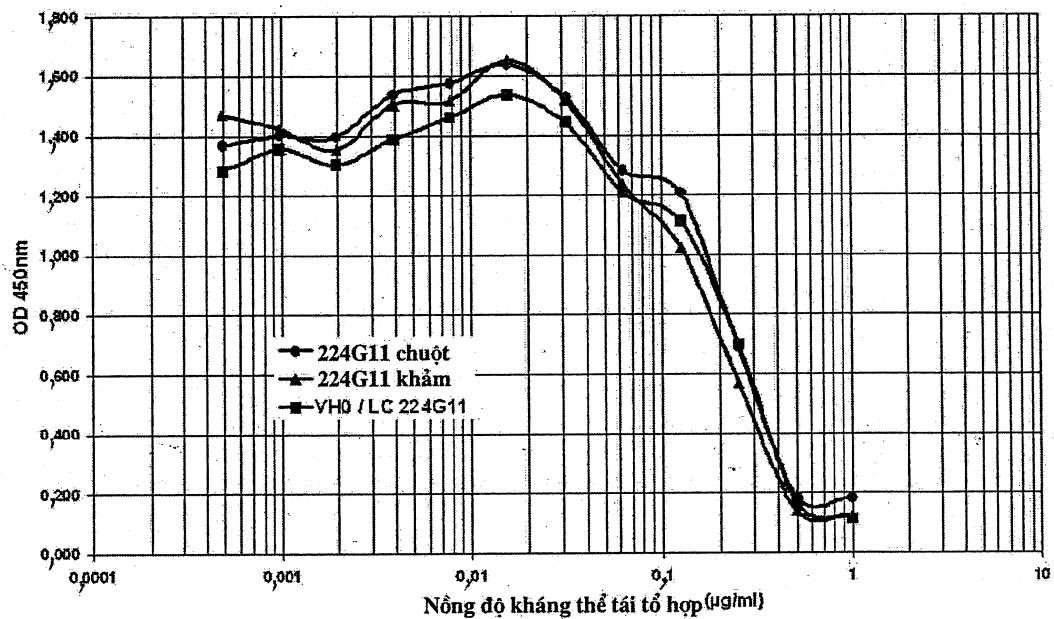


Fig.67

|                       | FR1-IMGT<br>(1-26)                                                                                  |       |       | CDR1-IMGT<br>(27-38)   |       |       | FR2-IMGT<br>(39-55)   |       |       | CDR2-IMGT<br>(56-65) |       |       |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
|                       | 1                                                                                                   | 10    | 20    | 30                     | 40    | 50    | 60                    |       |       |                      |       |       |
| 224G11 VL             | .....                                                                                               | ..... | ..... | .....                  | ..... | ..... | .....                 | ..... | ..... | .....                | ..... | ..... |
|                       | DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRAS ESVDSYANSF.. MHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....                                  |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Vùng khung người ngắn | E-----T-SL-P-E---L-----LA-----A-R-----                                                              |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Hạng                  | *            * 3* 2 3            11            2 3                                                  |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| 224G11 HZ VL3         | EIVLTQSPATLALS LGQRATISCRAS ESVDSYANSF.. MHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....                                  |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Vùng khung người dài  | ---M---D-----E---N-KS---LA-----                                                                     |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Hạng                  | 1            *            3            * 32            11                                           |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| 224G11 HZ VL6         | DIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCRAS ESVDSYANSF.. MHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....                                   |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
|                       | FR3-IMGT<br>(66-104)                                                                                |       |       | CDR3-IMGT<br>(105-113) |       |       | FR4-IMGT<br>(114-123) |       |       |                      |       |       |
|                       | 70                                                                                                  | 80    | 90    | 100                    | 110   | 120   |                       |       |       |                      |       |       |
| 224G11 VL             | .....                                                                                               | ..... | ..... | .....                  | ..... | ..... | .....                 | ..... | ..... | .....                | ..... | ..... |
|                       | NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC QQSKEDPLT FSGGTKLEMK                                        |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Vùng khung người ngắn | -RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V---                                                                  |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Hạng                  | 22*            1            32* 33 2 3            3            *                                    |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| 224G11 HZ VL3         | NLETGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPLEADDVATYYC QQSKEDPLT FSGGTKVEIK                                        |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Vùng khung người dài  | TR---V-.D-----.-G-----SSLQ-E---V---                                                                 |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| Hạng                  | 22            *            *            1            32* 3 3            3            3            * |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |
| 224G11 HZ VL6         | NLESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTINPLEADDVATYYC QQSKEDPLT FSGGTKVEIK                                        |       |       |                        |       |       |                       |       |       |                      |       |       |

Fig.68

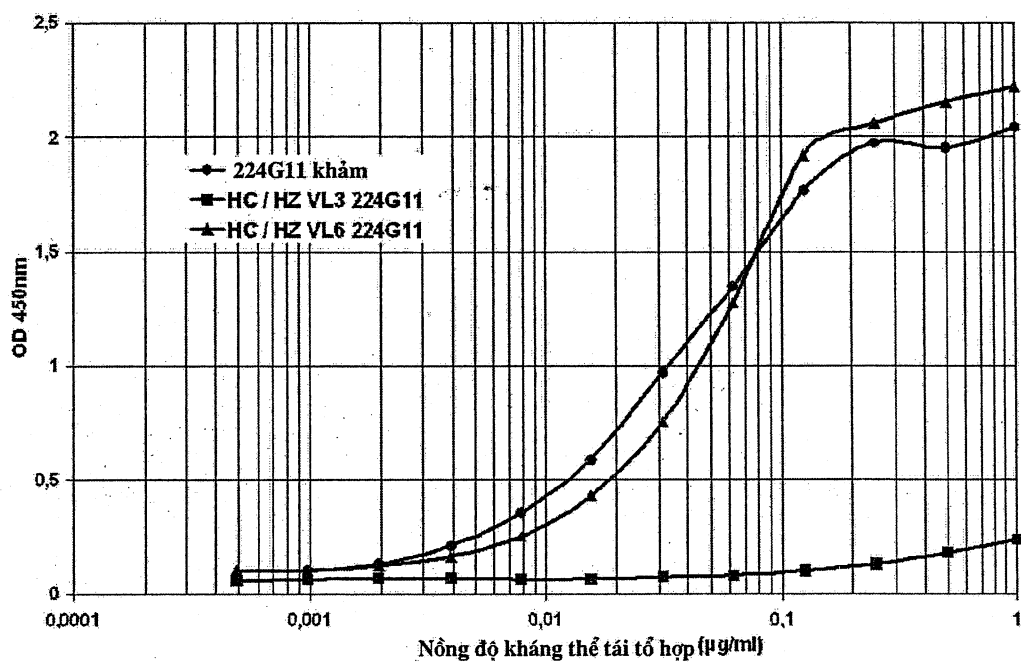


Fig.69

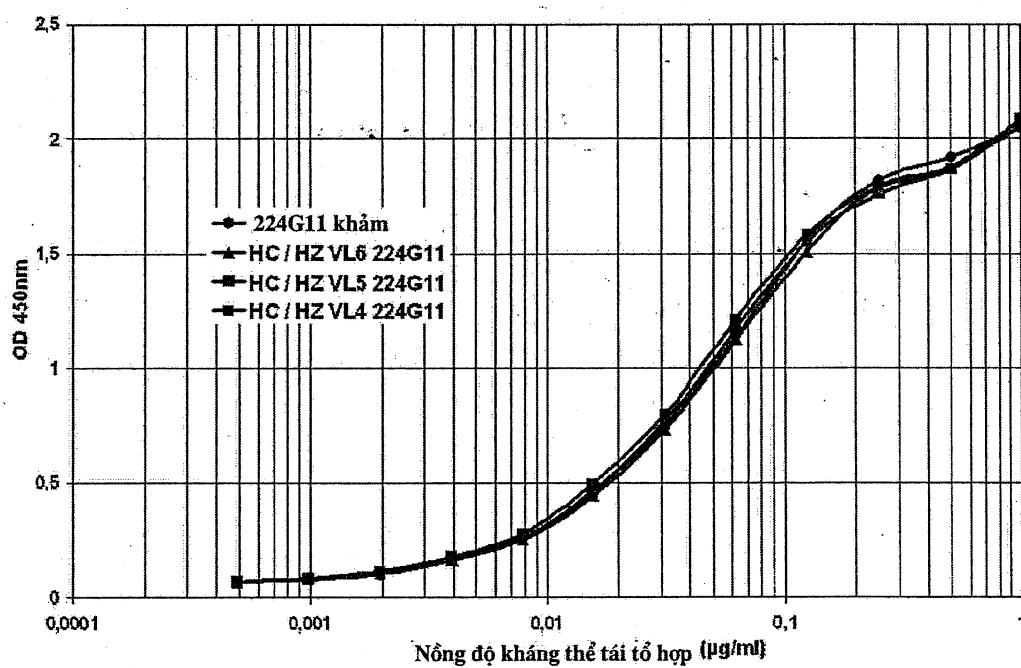


Fig.70

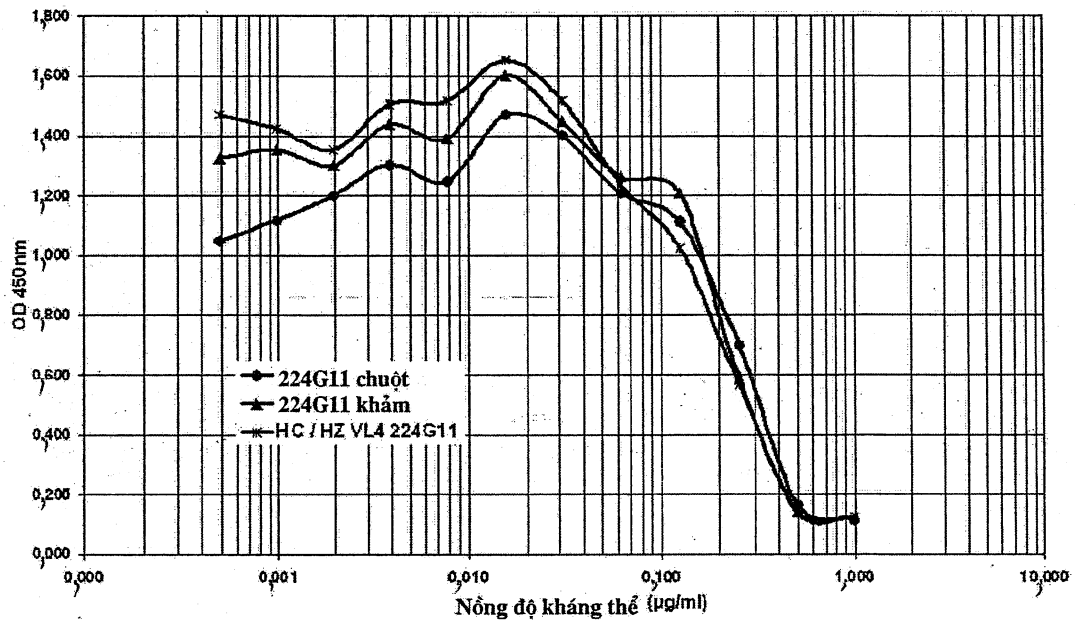


Fig.71

|                                  | FR1-IMGT<br>(1-26)                     |              |                  |          | CDR1-IMGT<br>(27-38)   |       | FR2-IMGT<br>(39-55)   |       | CDR2-IMGT<br>(56-65) |       |
|----------------------------------|----------------------------------------|--------------|------------------|----------|------------------------|-------|-----------------------|-------|----------------------|-------|
|                                  | 1                                      | 10           | 20               |          | 30                     |       | 40                    | 50    | 60                   |       |
| 224G11 HZ VL4<br>làm giống người | .....                                  | .....        | .....            | .....    | .....                  | ..... | .....                 | ..... | .....                | ..... |
|                                  | DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS             | ESVDSYANSF.. | MMWYQQKPGQPPLLIY | RAS..... |                        |       |                       |       |                      |       |
|                                  | \$                                     | *            | !                | * !!     |                        |       | SS                    |       |                      |       |
|                                  | FR3-IMGT<br>(66-104)                   |              |                  |          | CDR3-IMGT<br>(105-113) |       | FR4-IMGT<br>(114-123) |       |                      |       |
|                                  | 70                                     | 80           | 90               | 100      | 110                    |       | 120                   |       |                      |       |
| 224G11 HZ VL4<br>làm giống người | .....                                  | .....        | .....            | .....    | .....                  | ..... | .....                 | ..... | .....                | ..... |
|                                  | TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC | QQSKEDPLT    | FGGGTKVEIK       |          |                        |       |                       |       |                      |       |
|                                  | !!                                     | *            | *                | \$       | !!*!                   | !     | !                     | !     | *                    | *     |

Fig.72

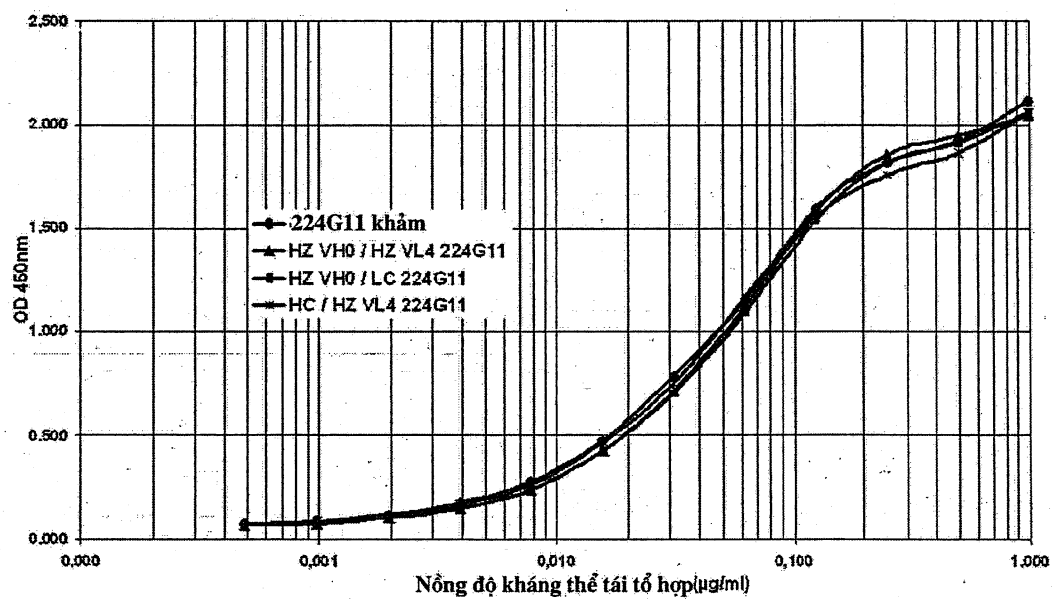


Fig.73

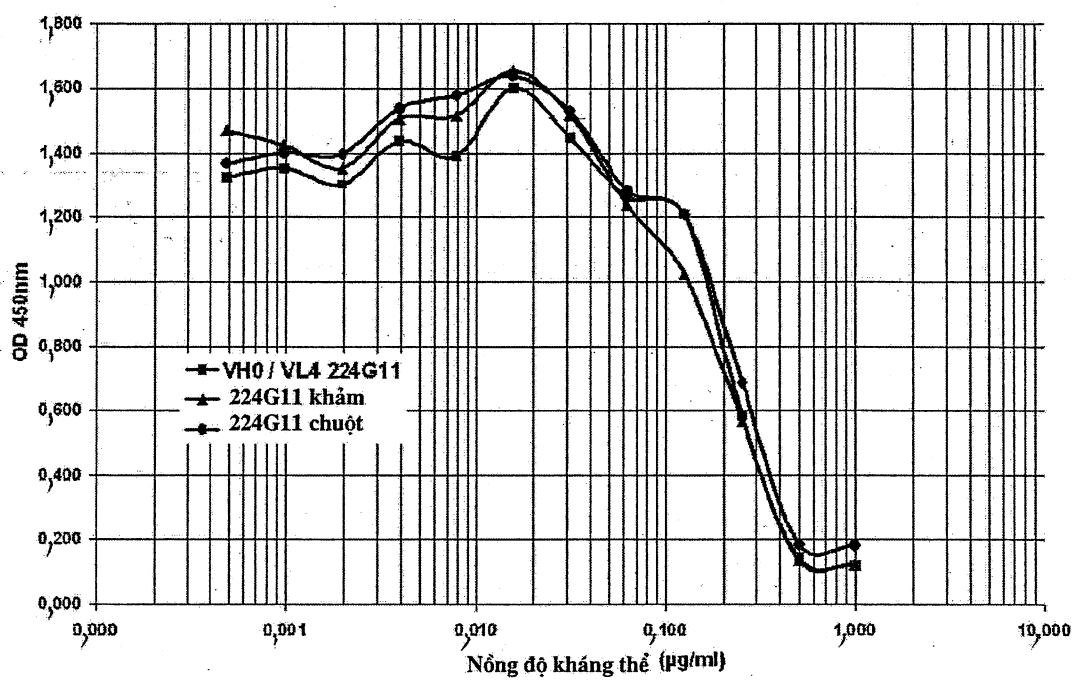


Fig.74

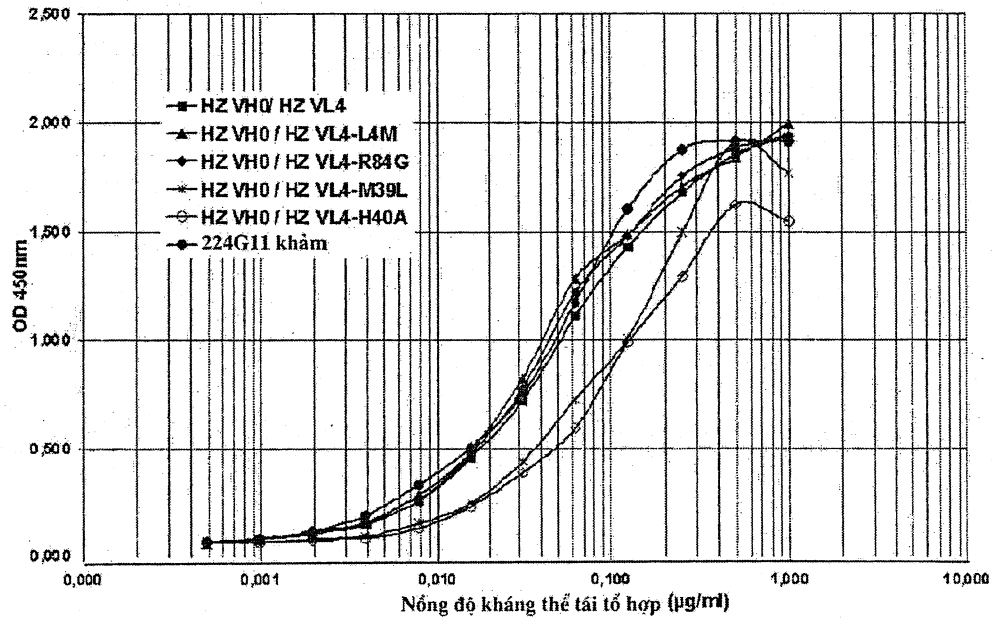


Fig.75

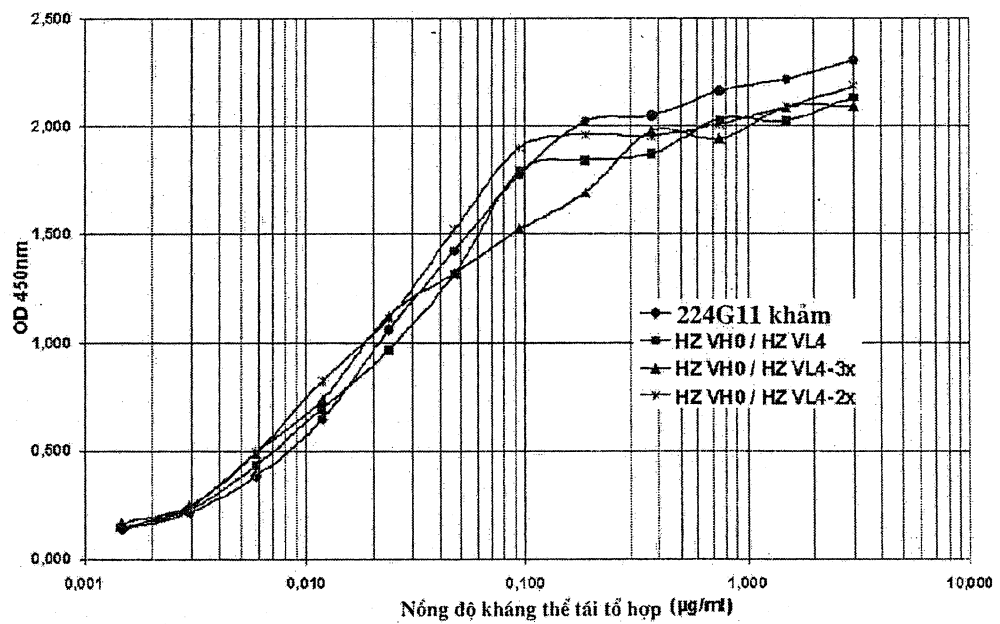
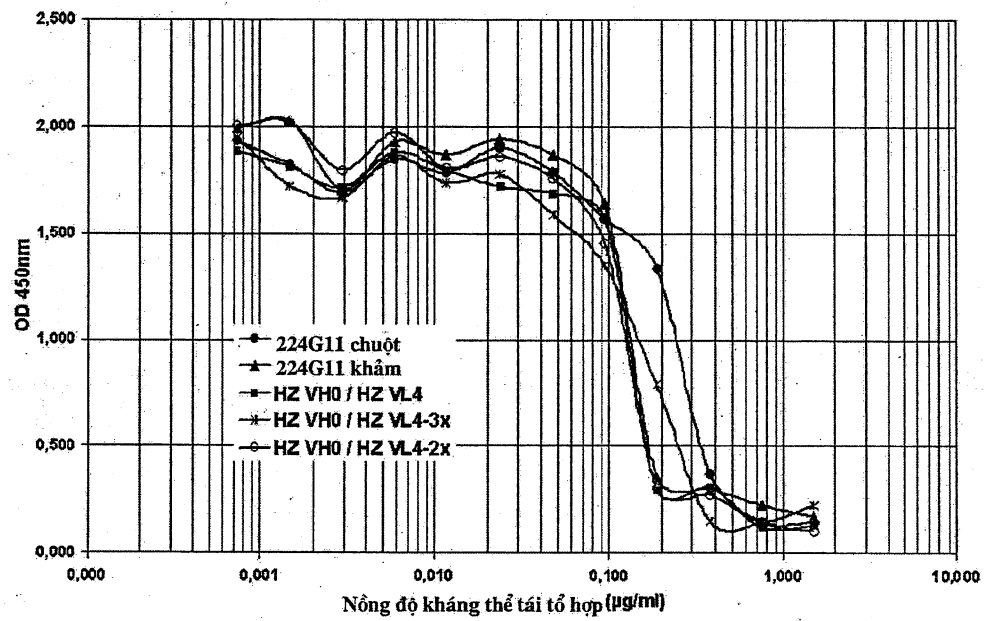


Fig.76

**Fig.77**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Kháng thể phân lập được, quy trình sản xuất kháng thể này và chế phẩm chứa kháng thể này

<130> D25728

<140> PCT/EP2008/05

<141> 2008-07-10

<150> EP 07301231.2

<151> 2007-07-12

<150> US 60/929,789

<151> 2007-07-12

<150> US 61/020,639

<151> 2008-01-11

<160> 71

<170> Patent với phiên bản 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr

1 5



<210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 5  
 Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr  
 1 5

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 6  
 Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 7  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn  
 1 5

<210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 8  
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr  
 1 5

<210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 9  
 Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 10  
 Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 3  
 <212> PRT

<213> mus musculus

<400> 11  
Arg Ala Ser  
1

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 12  
Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 13  
Glu Ser Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe  
1 5 10

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 14  
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 15  
Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
1 5

<210> 16  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 16  
Ala Ala Thr  
1

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> mus musculus

<400> 17  
Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 18  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

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

<210> 19  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 19  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 20  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Met | Glu | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Ala | Arg | Gly | Arg | Tyr | Val | Gly | Tyr | Tyr | Tyr | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

```
<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> mus musculus
```

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

```
<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> mus musculus
```

|          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 22 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly      | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly |
| 1        |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gln      | Arg | Ala | Thr | Ile | Ser | Cys | Arg | Val | Ser | Glu | Ser | Ile | Asp | Thr | Tyr |
|          |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly      | Asn | Ser | Phe | Ile | His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro |
|          |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Lys      | Leu | Leu | Ile | Tyr | Arg | Ala | Ser | Asn | Leu | Glu | Ser | Gly | Ile | Pro | Ala |
|          | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Arg      | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Arg | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Asn |
| 65       |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Pro      | Val | Glu | Ala | Asp | Asp | Ser | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Ser | Asn |
|          |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Glu      | Asp | Pro | Phe | Thr | Phe | Gly | Ser | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Met | Lys |     |
|          |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

```
<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> mus musculus
```

```

<400> 23
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1          5          10          15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
          20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
          35          40          45

```

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 24  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 24  
 ggatacatat tcaactgcata cacc

24

<210> 25  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 25  
 attaaaccaa acaatggtct tgct

24

<210> 26  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 26  
 gcaagatctg agattacgac ggaatttgac tac

33

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 27  
 gggtattcat tcaactgacta cacc

24

<210> 28  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 28  
 attaatcctt acaatggtgg tact

24

<210> 29  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 29  
 gcaagagagg aaattacgaa ggactttgat ttc

33

<210> 30

<211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 30  
 ggatacacat tcactgacta caac 24  
  
 <210> 31  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 31  
 attaataccta acaatggtgg tact 24  
  
 <210> 32  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 32  
 gcaagagggga ggtatggtgg ttactactat gctatggact ac 42  
  
 <210> 33  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 33  
 gaaagtgttg atagttatgc caatagtttt 30  
  
 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 34  
 cgtgcatcc 9  
  
 <210> 35  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 35  
 cagcaaagta aggaggatcc tctcacg 27  
  
 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 36  
 gaaagtattg atacttatgg caatagtttt 30  
 <210> 37  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 37  
cagcaaagta atgaggatcc attcacg 27

<210> 38  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> mus musculus

<400> 38  
gagaatattt acagtaat 18

<210> 39  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> mus musculus

<400> 39  
gctgcaaca 9

<210> 40  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> mus musculus

<400> 40  
caacattttt ggggtcctcc gtacacg 27

<210> 41  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> mus musculus

<400> 41  
gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
tcctgcaaga cttctggata catattcact gcatacacca tgcactgggt gaggcagagc 120  
cttgagagaga gccttgactg gattggagggt attaaaccaa acaatggtct tgctaactac 180  
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240  
atggacctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagatctgag 300  
attacgacgg aatttgacta ctggggccaa ggcaccgctc tcacagtctc ctca 354

<210> 42  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> mus musculus

<400> 42  
gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagatt 60  
tcctgcaagg cttctgggta ttcattcact gactacaccc tgaactgggt gaagcagagc 120  
catggaaaga cccttgagtg gattggactt attaatacctt acaatggtgg tactacctac 180  
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcacccag cacagcctac 240  
atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggaa 300  
attacgaagg actttgattt ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 43  
<211> 363  
<212> ADN  
<213> mus musculus

<400> 43

```

gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag          ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120
catggaatga gccttgagtg gattggagat attaataccta acaatgggtg tactatcttc 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagggagg 300
tatgttggtt actactatgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 44  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

```

<400> 44
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatgcca atagttttat gcactggtac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccagggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaagga ggatcctctc 300
acgttcggct cggggacaaa attggaaatg aaa 333

```

<210> 45  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

```

<400> 45
ggcattgtgt tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggaca gagggccacc 60
atatcctgca gaggcagtga aagtattgat acttatggca atagttttat aactggttac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccagggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgattc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccattc 300
acgttcggct cggggacaaa gttggaaatg aaa 333

```

<210> 46  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

```

<400> 46
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatctac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagtagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
gaagatcttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggtc ctccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggagataaa g 321

```

<210> 47  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mã đối với housekeeping gene Ribosomal protein, large, P0  
 (RPL0)

```

<400> 47
gaaactctgc attctcgctt cctg 24

```

<210> 48



<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Đoạn mỗi đối với gen housekeeping P0(RPL0)protein Ribosom  
  
 <400> 48  
 aggactcggtt tgtacccggtt ga 22  
  
 <210> 49  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Đoạn mỗi đối với gen housekeeping P0(RPL0)protein Ribosom  
 <400> 49  
 tgcagattgg ctacccaact gttgca 26  
  
 <210> 50  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Đoạn mỗi đối với HGF  
  
 <400> 50  
 aacaatgcct ctggttcc 18  
  
 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Đoạn mỗi đối với HGF  
  
 <400> 51  
 cttgtagctg cgtcctttac 20  
  
 <210> 52  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Mẫu lai thù đối với HGF  
  
 <400> 52  
 ccttcaatag catgtcaagt ggagtga 27  
  
 <210> 53  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Đoạn mỗi đối với c-Met

<400> 53  
 cattaaagga gacctcacca tagctaatt  
 28

<210> 54  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi đối với c-Met

<400> 54  
 cctgatcgag aaaccacaac ct  
 22

<210> 55  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mẫu lai thử đối với c-Met

<400> 55  
 catgaagcga ccctctgatg tccca  
 25

<210> 56  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 56  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp.  
 1 5

<210> 57  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 57  
 Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 58  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 58  
 Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 59  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

&lt;400&gt; 59

Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr

1

5

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mus musculus

&lt;400&gt; 60

Thr Thr Ser

1

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mus musculus

&lt;400&gt; 61

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1

5

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mus musculus

&lt;400&gt; 62

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

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mus musculus

&lt;400&gt; 63

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ile | Met | Ser | Ala | Ser | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Lys | Val | Thr | Leu | Thr | Cys | Ser | Ala | Ser | Ser | Ser | Val | Ser | Ser | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Tyr | Leu | Tyr | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Ser | Ser | Pro | Lys | Leu | Trp |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ile | Tyr | Thr | Thr | Ser | Ile | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Ala | Arg | Phe | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Ser | Tyr | Ser | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Met | Glu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
                   85                  90                  95  
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys  
                   100                  105

<210> 64  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 64  
 ggctacactt ttacttctca ctgg 24

<210> 65  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 65  
 attaacccta ccaactgggttc tact 24

<210> 66  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 66  
 gcaataggag gatatgggtc ctggtttgct tac 33

<210> 67  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 67  
 tcaagtgtaa gttccaccta c 21

<210> 68  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 68  
 accacatcc 9

<210> 69  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

<400> 69  
 catcagtga gtagttaccc attcacg 27

<210> 70  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

&lt;400&gt; 70

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| caggtccagc | ttcagcagtc | tggggctgaa | ctggcaaaac | ctggggcctc | agtgaagatg | 60  |
| tcctgcaagg | cttctggcta | cacttttact | tcctactgga | tgaactgggt | gaaacagagg | 120 |
| cctggacagg | gtctggaatg | gattggatac | attaacccta | ccactggttc | tactgactac | 180 |
| aatcagaagt | taaaggacaa | ggccacattg | actgcagaca | aatcctccaa | cacagcctac | 240 |
| atgcaactga | gcagcctgac | atctgaggac | tctgcagtct | attactgtgc | aataggagga | 300 |
| tatgggtcct | ggtttgctta | ctggggccaa | gggactctgg | tcactgtctc | tgca       | 354 |

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; mus musculus

&lt;400&gt; 71

|            |            |             |            |            |            |     |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| caaattgttc | tcacccagtc | tccagcaatc  | atgtctgcat | ctcctgggga | gaaggtcacc | 60  |
| ttgacctgca | gtgccagctc | aagtgttaagt | tccacctact | tgtactggta | ccagcagaag | 120 |
| ccaggatcct | cccccaaact | ctggatttat  | accacatcca | tcctggcttc | tggagtcctt | 180 |
| gctcgcttca | gtggcagtgg | gtctgggacc  | tcttactctc | tcacaatcag | cagcatggag | 240 |
| actgaagatg | ctgcctctta | tttctgccat  | cagtggagta | gttaccatt  | cacgttcggc | 300 |
| tcggggacaa | agttggacat | aaaa        |            |            |            | 324 |