(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) **1-0031232**

(51)[7] **C07K 16/28**

(13) **B**

(21) 1-2016-04265
(22) 27/04/2015
(86) PCT/EP2015/059050 27/04/2015
(87) WO2015/162292 29/10/2015
(30) 61/984,160 25/04/2014 US
(45) 25/02/2022 407
(43) 27/03/2017 348A

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)
45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt, France

(72) GOETSCH, Liliane (FR); BROUSSAS, Matthieu (FR); BEAU-LARVOR, Charlotte (FR); CHAMPION, Thierry (FR); ROBERT, Alain (FR).

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

(54) KHÁNG THỂ NỘI BÀO HÓA, THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT VÀ DƯỢC PHẨM

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó; thể lai của chuột được chọn từ thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 và I-4774 tương ứng được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur Pháp vào ngày 30 tháng 05 năm 2013, ngày 26 tháng 06 năm 2013, ngày 26 tháng 06 năm 2013, ngày 24 tháng 04 năm 2013 và ngày 26 tháng 06 năm 2013; thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào; dược phẩm chứa kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R này và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng; và dược phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể-dược chất nêu hên và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng thể đơn dòng, có khả năng gắn kết với IGF-1R, cũng như trình tự axit amin và axit nucleic mã hoá kháng thể này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, có khả năng gắn kết với IGF-1R và, bằng cách tạo quá trình nội bào hóa IGF-1R, đang được nội bào hóa vào tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin 1 (insulin-like growth factor 1 receptor) được gọi là IGF-1R (còn được gọi là IGF1R hoặc IGF-IR) là thụ thể có hoạt tính tyrosin kinaza có 70% tương đồng với thụ thể insulin IR. IGF-1R là glycoprotein có phân tử lượng khoảng 350.000. Nó là thụ thể tetrame khác loại mà mỗi một nửa của nó được liên kết bởi các cầu đisulfua - bao gồm tiểu đơn vị α ngoại bào và tiểu đơn vị β xuyên màng. IGF-1R gắn kết với IGF1 và IGF2 với ái lực rất mạnh (Kd #1 nM) nhưng lại có khả năng gắn kết với insulin với ái lực yếu hơn từ 100 đến 1000 lần. Ngược lại, IR gắn kết với insulin với ái lực rất mạnh nhưng IGF chỉ gắn kết với thụ thể insulin với ái lực yếu hơn 100 lần. Các miền tyrosin kinaza của IGF-1R và IR có mức độ tương đồng trình tự rất cao mặc dù các vùng có mức độ tương đồng thấp hơn tương ứng liên quan đến vùng giàu xystein nằm trên tiểu đơn vị α và phần có đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β. Sự khác nhau về trình tự quan sát được ở tiểu đơn vị α nằm trong vùng gắn kết của các phối tử và do đó tương ứng nằm ở điểm xuất phát có ái lực tương đối của IGF-1R và IR đối với các IGF và insulin. Sự khác nhau về phần có đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β tạo ra sự khác biệt trong quá trình truyền tín hiệu của hai thụ thể này; quá trình phân bào, quá trình biệt hóa và tác động kháng lại sự gây chết tế bào theo chương trình do IGF-1R gây ra, đồng thời quá trình hoạt hóa IR chủ yếu liên quan đến các tác động ở mức độ của quá trình trao đổi chất.

Các protein tyrosin kinaza của bào tương được hoạt hóa bằng cách gắn kết phối tử với miền ngoại bào của thụ thể. Về phần mình, quá trình hoạt hóa các kinaza liên quan đến quá trình kích thích các chất nền khác nhau trong nội bào, bao gồm IRS-1, IRS-2,

Shc và Grb 10. Hai chất nền chính của IGF-1R là IRS và Shc gây ra phần lớn các tác động sinh trưởng và biệt hóa liên quan đến việc gắn kết các IGF với thụ thể này bằng cách hoạt hóa nhiều phần tử tác động nằm sau. Do đó, sự sẵn có các chất nền có thể tạo ra tác động sinh học cuối liên quan đến quá trình hoạt hóa IGF-1R. Nếu IRS-1 chiếm ưu thế, thì các tế bào này có xu hướng tăng sinh và biến đổi. Khi Shc bị kìm hãm, thì các tế bào này lại có xu hướng biệt hóa. Dường như quá trình chủ yếu liên quan đến các tác động bảo vệ chống lại sự gây chết tế bào theo chương trình là quá trình phosphatiđyl-inositol 3-kinaza (PI 3-kinaza).

Vai trò của hệ IGF trong quá trình sinh bệnh ung thư có thể là đối tượng nghiên cứu sâu rộng trong chục năm gần đây. Mối quan tâm này nảy sinh sau khi phát hiện ra rằng trên thực tế ngoài các đặc tính phân bào và chống lại sự gây chết tế bào theo chương trình, IGF-1R dường như là cần thiết đối với sự thiết lập và duy trì kiểu hình biến nạp. Trên thực tế, đã nhận thấy rằng sự biểu hiện quá mức hoặc sự hoạt hóa cơ định của IGF-1R trong rất nhiều tế bào, dẫn đến sự phát triển của các tế bào này độc lập với nền mang trong môi trường không chứa huyết thanh bào thai bò, và tạo ra các khối u ở chuột nhắt trụi lông. Chính đặc tính này không phải là đặc tính duy nhất do có rất nhiều sản phẩm khác nhau chứa gen biểu hiện quá mức có thể biến nạp các tế bào, bao gồm nhiều thụ thể của các yếu tố sinh trưởng. Tuy nhiên, việc phát hiện quan trọng mà đã được chứng minh một cách rõ ràng về vai trò chính gây ra bởi IGF-1R trong quá trình biến nạp là các tế bào IGF-1R$^-$, trong đó gen mã hoá IGF-1R đã không được hoạt hóa, khó có thể biến nạp hoàn toàn bởi các tác nhân khác nhau mà thường có khả năng biến nạp các tế bào này, như protein E5 của virut papiloma của bò, sự biểu hiện quá mức EGFR hoặc PDGFR, kháng nguyên T của SV 40, ras đã được hoạt hóa hoặc tổ hợp của hai yếu tố nêu sau này.

IGF-1R được biểu hiện trong nhiều khối u và dòng khối u và các IGF làm gia tăng sự phát triển của khối u bằng cách gắn chúng với IGF-1R. Các lý lẽ khác liên quan đến vai trò của IGF-1R trong quá trình sinh bệnh ung thư xuất phát từ các nghiên cứu sử dụng các kháng thể đơn dòng của chuột hướng tới thụ thể hoặc sử dụng các tính trội âm của IGF-1R. Trên thực tế, các kháng thể đơn dòng của chuột hướng tới IGF-1R có thể ức chế quá trình tăng sinh của nhiều dòng tế bào trong môi trường nuôi cấy và sự phát triển của các tế bào của khối u *in vivo*. Tương tự, đã nhận thấy rằng tính trội âm của IGF-1R có khả năng ức chế quá trình tăng sinh của khối u.

Trong hoàn cảnh như vậy, trong thời gian dài IGF-1R đã và đang được xem là đích quan trọng trong lĩnh vực bệnh ung thư. Nhiều dự án hướng tới IGF-1R (kháng thể nhân tạo hoặc kháng thể của người hoặc phân tử nhỏ) được bắt đầu để phát triển các kháng thể IGF-1R nhằm điều trị bệnh ung thư và hơn 70 thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện ở các chỉ định khác nhau. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa từng có dự án nào thành công và cũng không có kháng thể IGF-1R trên thị trường mặc dù sự biểu hiện quá mức thường xuyên của đích này đã được mô tả đối với nhiều bệnh nhân trong một loạt các chỉ định.

Hơn nữa, một loạt thử nghiệm lâm sàng liên quan đến kháng thể kháng IGF-1R kết hợp với kháng thể kháng EGFR để hướng tới cả EGFR lẫn IGF-1R, đều không phải là các kháng thể trong số các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân bị đột biến KRAS.

Do đó, IGF-1R hiện không được coi là đích quan trọng và trong nghiên cứu về các kháng thể dùng để điều trị tiềm năng, IGF-1R dường như không được coi là mối quan tâm cụ thể.

Tuy nhiên, cũng có thông báo rằng các cố gắng để sản xuất các kháng thể IGF-1R là nhằm hướng tới các kháng thể trần, tức là các kháng thể hữu ích bởi các đặc tính nội tại của chúng. Về mặt này, IGF-1R được xem là đích không thích hợp để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch như thể tiếp hợp kháng thể-dược chất do IGF-1R được mô tả là đích cũng được biểu hiện rộng rãi bởi các tế bào bình thường, kể cả tế bào của mạch máu. Về nghĩa này, đã có thông báo rằng kháng thể IGF-1R mới đây, tức là AVE1642, được phát triển làm kháng thể trần mà không gắn với dược chất. Nó tương tự như các kháng thể IGF-1R khác hiện đang được phát triển và với toàn bộ chúng đều không thành công trong các thử nghiệm lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, mục đích của sáng chế là đề cập đến kháng thể IGF-1R gắn kết đặc hiệu với IGF-1R và thích hợp để gắn với dược chất. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể IGF-1R có các đặc tính cụ thể như kháng thể này là kháng thể chọn lọc tối ưu được sử dụng để gắn vào thể tiếp hợp miễn dịch.

Theo một phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, i) gắn kết với IGF-1R của người, và ii) được nội bào hóa sau khi gắn kết với IGF-1R của người.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó kháng thể này được chọn từ:

a. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

b. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

c. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.12; và

d. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11.

Sáng chế cũng đề cập đến thể lai của chuột được chọn từ thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 và I-4774 tương ứng được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur Pháp vào ngày 30 tháng 05 năm 2013, ngày 26 tháng 06 năm 2013, ngày 26 tháng 06 năm 2013, ngày 24 tháng 04 năm 2013 và ngày 26 tháng 06 năm 2013.

Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, như nêu trên, được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R như nêu trên và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể-dược chất như nêu trên và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc điểm và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn phần mô tả dưới đây cùng các hình vẽ kèm theo.

Fig.1: Ví dụ về đặc tính gắn kết Biacore thu được bằng 3 kháng thể trên hIGF-1R ECD được bắt giữ bởi kháng thể kháng trình tự đánh dấu His.

Fig.2: Sơ đồ lập bản đồ epitop được xác định từ bảng gồm 15 kháng thể đơn dòng kháng hIGF-1R tương thích với 5 nhóm epitop đã xác định được. Các nhóm được đánh số không được liên kết với vị trí liên quan đến trình tự cũng như cấu trúc 3D của kháng nguyên.

Fig.3A-Fig.3C: Kháng thể gắn kết với IGF-1R tự nhiên của người bằng cách phân tích FACS. Fig.3A thể hiện đường cong chuẩn độ, trên dòng tế bào MCF-7, của một kháng thể kháng IGF-1R thể khảm đại diện đối với mỗi nhóm tạo cụm epitop. MFI thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình. Fig.3B thể hiện EC_{50} của kháng thể kháng IGF-1R của chuột và kháng thể thể khảm kháng IGF-1R trên dòng tế bào MCF-7. Fig.3C thể hiện B_{max} của kháng thể thể khảm kháng IGF-1R trên dòng tế bào MCF-7.

Fig.4A và Fig.4B: Đánh giá khả năng nhận diện hIGF-1R bằng cách sử dụng các tế bào đã được chuyển nhiễm với các tế bào chưa nhiễm bệnh. Fig.4A thể hiện đường cong chuẩn độ của một kháng thể kháng IGF-1R thể khảm đại diện của mỗi nhóm tạo cụm epitop trên dòng tế bào IGF-1R$^+$. MFI thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình. Fig.4B thể hiện khả năng gắn kết của một kháng thể kháng IGF-1R thể khảm đại diện của mỗi nhóm tạo cụm epitop trên dòng tế bào IGF-1R$^-$ của người. MFI thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình.

Fig.5A và Fig.5B: Đánh giá tính đặc hiệu của các Ab với hIGF-1R và hIR bằng cách sử dụng các tế bào đã được chuyển nhiễm bệnh. Fig.5A thể hiện khả năng gắn kết của Ab kháng IGF-1R của chuột trên dòng tế bào đã chuyển nhiễm hIR$^+$. Fig.5B thể hiện khả năng gắn kết của Ab kháng IGF-1R thể khảm trên dòng tế bào IR+. MFI thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình. Trong bảng A và B, kháng thể kháng hIR đang có trên thị trường được mô tả là GRO5 (Calbiochem) được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương.

Fig.6: Khả năng gắn kết của Ab kháng IGF-1R của chuột trên dòng tế bào IM-9. MFI thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình. Mab kháng hIR GRO5 được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương.

Fig.7A, Fig.7B và Fig.7C: Đánh giá khả năng nhận diện của IGR-1R của khỉ. Fig.7A thể hiện đường cong chuẩn độ của một kháng thể kháng IGF-1R thể khảm đại diện của mỗi nhóm tạo cụm epitop trên dòng tế bào COS-7. MFI thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình. Fig.7B thể hiện EC_{50} của kháng thể kháng IGF-1R của chuột lẫn kháng thể thể khảm kháng IGF-1R trên dòng tế bào COS-7. Fig.7C thể hiện EC_{50} của kháng thể thể khảm kháng IGF-1R trên cả các tế bào đã được chuyển nhiễm hIGF-1R$^+$ lẫn các tế bào COS-7. GR11L (Calbiochem) được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương.

Fig.8: So sánh khả năng gắn kết của c208F2 trên hIGF-1R ECD hoặc IGF-1R ECD của khỉ Cynomolgus bằng cách sử dụng thử nghiệm Biacore. Đồ thị cảm biến thu được trên Biacore X100 dựa trên kỹ thuật SPR bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 được hoạt hóa với nhiều 11000 RU của kháng thể His kháng Tag của chuột nhắt được ghép hóa học vào nền carboxymetyl đextran. Thử nghiệm được thực hiện với tốc độ dòng bằng là 30µL/phút ở nhiệt độ 25°C bằng cách sử dụng HBS-EP+ làm dung dịch đệm chạy và dung dịch đệm pha loãng mẫu. Fig này thể hiện sự xếp chồng của 4 đồ thị cảm biến độc lập được duỗi thẳng trên trục x khi bắt đầu tiêm dịch rửa giải lần đầu tiên và trên trục y bởi mức nền được xác định ngay trước khi tiêm lần đầu tiên này. Đồ thị cảm biến thu được cùng với việc bắt giữ trình tự của người của IGF-1R hòa tan tái tổ hợp được đánh dấu bằng các hình thoi. Đồ thị cảm biến thu được cùng với việc bắt giữ trình tự của khỉ của IGF-1R hòa tan tái tổ hợp được biểu thị bởi các hình tam giác. Các ký hiệu màu trắng tương ứng với các vòng trống (5 lần tiêm chất đệm hoạt động) và các ký hiệu màu đen tương ứng với các lần tiêm của khoảng nồng độ của c208F2 (5, 10, 20, 40 và 80 nM).

Fig.9: Đánh giá tác dụng nội tại của kháng thể kháng hIGF-1R đối với quá trình phosphoryl hoá thụ thể so với IGF1.

Fig.10: Quá trình ức chế khả năng phosphoryl hoá IGF-1R để đáp ứng với IGF-1 bởi kháng hIGF-1R của chuột.

Fig.11: Quá trình gắn kết bề mặt của tế bào của kháng thể kháng IGF-1R được điều hòa giảm ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào MCF-7 được ủ ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ với 10μg/mL của mỗi Ab. Fig này thể hiện ΔMFI.

Fig.12A và Fig.12B: Phân hủy bề mặt kháng thể. Kháng thể gắn kết với bề mặt tế bào được đánh giá sau 10, 20, 30, 60 và 120 phút ở nhiệt độ 37°C. Fig.12A thể hiện % IGF-1R còn lại so với cường độ tín hiệu được đo ở nhiệt độ 4°C. Fig.12B thể hiện kết quả tính toán thời gian bán thải bằng cách sử dụng phần mềm Prims và sử dụng quá trình điều chỉnh sự phân hủy theo hàm số mũ.

Fig.13: Động học cỉa quá trình nội bào hóa của kháng thể được đánh giá bằng các phân tích FACS. Các tế bào được ủ với 10μg/mL Ab của chuột trong 0, 30 hoặc 60 phút ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào được thẩm thấu hoặc không được thẩm thấu và được ủ với Alexa 488 kháng IgG của chuột nhắt thứ cấp. Màng tương ứng với quá trình thẩm thấu w/o của cường độ tín hiệu. Tổng số tương ứng với cường độ tín hiệu sau khi thẩm thấu tế bào và bào chất tương ứng với Ab được nội bào hóa. Tên của mỗi kháng thể đã được đánh giá được mô tả trên đỉnh của mỗi đồ thị.

Fig.14A và Fig.14B: Hình vẽ của quá trình nội bào hóa Ab. Fig.14A: Các tế bào MCF-7 được ủ với m208F2 trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C và rửa trước khi ủ [a)] ở nhiệt độ 37°C trong 15 [b)], 30 [c)] và 60 [d)] phút. Các tế bào được cố định và thẩm thấu. m208F2 Ab được phát hiện bằng cách sử dụng IgG Alexa488 kháng chuột nhắt và Lamp-1 được phát hiện bằng kháng thể kháng Lamp-1 của thỏ và bằng IgG Alexa 555 kháng thỏ thứ cấp. Fig.14B (Phần I đến III): Các tế bào MCF-7 được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C với mỗi kháng thể kháng hIGF-1R khác của chuột cần thử nghiệm và sau đó được nhuộm như được mô tả trên đây. Quá trình đồng định vị được xác định bằng cách sử dụng quá trình nhúng đánh dấu đồng định vị của phần mềm về hình ảnh J.

Fig.15: Liên quan đến quá trình lysosom trong quá trình phân hủy kháng thể.

Fig.16: Đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể kháng hIG-1R của chuột ở các độ pH khác nhau. EC50 thu được từ quá trình gắn kết của các kháng thể khác nhau được đánh giá trên MCF-7 bằng cách sử dụng chất đệm với khoảng độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 5 đến 8.

Fig.17: Đánh giá khả năng của Ab kháng IGF-1R đã chọn để tạo ra độc tính tế bào trên thử nghiệm Fab-ZAP. A) Các tế bào MCF-7 được ủ với kháng thể thể khảm kháng IGF-1R có nồng độ tăng dần kết hợp với bộ kit Fab-ZAP của người. Khả năng sống sót của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm đánh giá sự sống sót của tế bào phát quang CellTiter-Glo®. Kháng thể thể khảm c9G4 được sử dụng làm kháng thể không liên quan. B) IC_{50} thu được từ các kết quả được mô tả trong phần A).

Fig.18: Mối liên quan giữa i) khả năng gây độc tế bào, ii) sự ảnh hưởng của độ pH đối với quá trình gắn kết Ab/IGF-1R, iii) tác dụng của Ab đối với quá trình phosphoryl hóa tạo ra bởi IGF-1 của IGF-1R và iv) xếp nhóm kháng thể.

Fig.19A-Fig.19D: Đặc tính gắn kết của dạng nhân tạo thứ nhất của cMab 208F2. Các đặc tính gắn kết của hz208F2 VH3/VL3 mAb được đánh giá trên dòng tế bào MCF-7 của người (Fig.19A), trên dòng tế bào Cos-7 của khỉ (Fig.19B) và trên dòng tế bào đã chuyển nhiễm của chuột biểu hiện thụ thể insulin của người (Fig.19C). Khả năng gắn kết của Mab 208F2 của chuột và thể khảm được đánh giá đồng thời. Kháng thể kháng hIR dòng GRO5 được sử dụng để kiểm tra sự biểu hiện của hIR trên dòng tế bào đã chuyển nhiễm (Fig.19D).

Fig.20A-Fig.20D: Tính phù hợp của thử nghiệm ELISA của kháng thể đa dòng AF305-NA được sử dụng đối với các thử nghiệm IHC. Fig.20A: Quá trình gắn kết với hIGF-1R, Fig.20B: Quá trình gắn kết với IR tái tổ hợp của người. Khả năng không nhận diện được hIR EDC và IR của tế bào được biểu hiện bởi các tế bào đã được chuyển nhiễm (Fig.20D) được so sánh với Ab GRO5 đối chứng trên các tế bào đã được chuyển nhiễm hIR này (Fig.20C).

Fig.21: Tính phù hợp của quá trình nhuộm hIGF-1R trên các phần FFPE từ các mảnh dị ghép biểu hiện các nồng độ hIGF-1R khác nhau. Hs746T được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm.

Fig.22A và Fig.22B: Đánh giá mức biểu hiện của hIGF-1R trên các phần mô FFPE khỏe mạnh. Các phần nhau được sử dụng làm phần đối chứng dương đối với các mô khỏe mạnh trong khi đó các mô dị ghép khối u dương tính được đưa vào mỗi chạy để tính toán mức biểu hiện hIGF-1R.

Fig.23: Đánh giá mức biểu hiện của hIGF-1R trên các phần mô NSCL FFPE. Bốn trường hợp là các trường hợp đại diện để nhuộm bền vững quan sát được trong bảng mô được phân tích lớn.

Fig.24: Đánh giá mức biểu hiện của hIGF-1R trên các phần mô FFPE bị bệnh ung thư vú. Ba trường hợp là các trường hợp đại diện để nhuộm bền vững quan sát được trong bảng mô được phân tích.

Fig.25: Đánh giá mức biểu hiện của hIGF-1R trên các phần mô FFPE từ các khối u khác nhau.

Fig.26: Sự xếp chồng của các đồ thị cảm biến thu được bằng thiết bị Biacore X100 trên cơ sở SPR ở nhiệt độ 25°C với chip cảm biến CM5 được hoạt hóa trên cả hai dòng tế bào có khoảng 12.000 RU của kháng thể đơn dòng kháng TagHis của chuột nhắt được ghép hóa học với nền carboxymetylđextran bằng cách sử dụng HBS-EP+ làm chất đệm hoạt động với tốc độ dòng bằng 30µL/phút. Mỗi đồ thị cảm biến (đồ thị thứ nhất được biểu thị bởi các hình tam giác và đồ thị thứ hai được biểu thị bởi hình thoi) tương ứng với vòng hoàn chỉnh: 1-Tiêm trong một phút dung dịch chứa h-IGF-1R tái tổ hợp (10µg/mL) trên dòng tế bào thứ hai. 2-Đối với đồ thị cảm biến thứ nhất: 5 lần tiêm dung dịch đệm hoạt động, mỗi lần trong 90 giây. Đối với đồ thị cảm biến thứ hai: năm lần tiêm trong khoảng nồng độ tăng dần của các dung dịch kháng thể c208F2 kháng IGF-1R, mỗi lần trong 90 giây. 1-Trễ 300 giây để xác định tốc độ phân hủy động học. 2-Tái tạo bề mặt bằng cách tiêm trong 45 giấy Glyxin 10mM, dung dịch đệm HCl có độ pH = 1,5.

Fig.27: Đồ thị cảm biến tương ứng với phép trừ của đồ thị cảm biến trống (5 lần tiêm HBS-EP+) cho đồ thị cảm biến thu được bằng khoảng nồng độ tăng dần của các dung dịch c208F2 kháng IGF-1R có mặt ở cột màu xám. Đồ thị cảm biến lý thuyết tương ứng với mô hình 1:1 với các tham số sau: k_{on} = (1,206 ± 0,036) x 10^6 $M^{-1}.s^{-1}$, k_{off} = (7,81 ± 0,18) x $10^{-5}s^{-1}$, Rmax = 307,6 ± 0,3 RU được biểu thị bởi đường màu đen mảnh. Nồng độ tính toán được của c208F2 được thông báo trên đồ thị: chỉ có nồng độ lớn nhất (24 nM) được xem là không đổi).

Fig.28: Hằng số phân ly tương ứng với trị số trung bình của bốn thử nghiệm thực hiện đối với mỗi kháng thể và tương ứng với tỷ lệ: k_{off}/k_{on} x 10^{12} được biểu thị ở dạng đơn vị pM. Các thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn (n=4).

Fig.29: Thời gian bán thải tương ứng với trị số trung bình của bốn thử nghiệm thực hiện đối với mỗi kháng thể và tương ứng với tỷ lệ: $Ln(2)/k_{off}/3600$ được biểu thị ở dạng đơn vị giờ. Các thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn (n=4).

Fig.30: Sự xếp chồng của hai đồ thị cảm biến tương ứng với hai chu trình thử nghiệm thực hiện trên thiết bị Biacore X100 với tốc độ dòng bằng 30µL/phút và ở nhiệt độ 25°C. Bước thứ nhất của chu trình này tương ứng với việc tiêm dung dịch chứa kháng thể c208F2 ở nồng độ 10µg/mL trong 60 giây trên dòng tế bào thứ hai chứa chip cảm biến CM5 được hoạt hóa bằng cách ghép hơn 10.500 RU kháng thể đơn dòng IgG Fc kháng người của chuột nhắt đã được liên kết hóa học với nền carboxymetyldextran bởi chức amin của nó. Chu trình thứ hai tương ứng với việc tiêm vào miền ngoại bào các dung dịch h-IGF-1R (hình thoi đặc) hoặc m-IGF-1R (hình thoi rỗng) chứa dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào thô trong 120 giây với độ trễ là 120 giây. Các mũi tên chỉ hai hướng thể hiện các vị trí đo nồng độ bắt giữ kháng thể và nồng độ gắn kết với IGF-1R được sử dụng trong nghiên cứu này.

Fig.31: Biểu đồ thể hiện tỷ lệ giữa nồng độ gắn kết với IGF-1R thu được đối với mỗi cấu trúc h/m IGF-1R thể khảm và nồng độ của c208F2 được bắt giữ trên dòng tế bào thứ hai chứa chip cảm biến trong chu trình tương ứng.

Fig.32A và Fig.32B: Biểu đồ thể hiện EC50 của hz208F2 H076/L024 trong khoảng độ pH từ 5 đến 8, độ pH axit làm giảm khả năng gắn kết của các kháng thể IGF-1R hz208F2 H076/L024 (A) và hz208F2 (H077/L018 (B) nhân tạo.

Fig.33: Khả năng gắn kết của Hz208F2 (10µg/mL) trên 170 RU kiểu hoang của phiên bản hòa tan của h-IGF1R (hình thoi màu đen) hoặc trên 120 RU đột biến C29 (Asp491>Ala) của thụ thể này. Mỗi thụ thể được bắt giữ bởi trình tự đánh dấu 66-His có đầu tận cùng C của chúng trên chip cảm biến CM5. Thử nghiệm được thực hiện bởi thiết bị Biacore X100 ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng bằng 30µL/phút bằng cách sử dụng HBS-EP+ thông thường làm chất đệm hoạt động.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "kháng thể", "ab", "Ab" hoặc "globulin miễn dịch" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể đơn dòng, kháng thể phân lập, kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, được tổng hợp hóa học, hoặc kháng thể tái tổ hợp (ví

dụ, kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ hoặc nguyên vẹn), kháng thể đa dòng, kháng thể đa trị hoặc kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) và cũng như mảnh kháng thể, với điều kiện chúng có hoạt tính sinh học mong muốn. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể tái tổ hợp.

Cụ thể hơn, phân tử như vậy cấu thành bởi glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bởi các liên kết đisulfua. Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (hoặc miền) (trong bản mô tả này được viết tắt là HCVR hoặc VH) và vùng ổn định của chuỗi nặng. Vùng ổn định của chuỗi nặng chứa ba miền CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là LCVR hoặc VL) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ. Vùng ổn định của chuỗi nhẹ chứa một miền CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng siêu biến đổi, được gọi là vùng xác định tính bổ trợ (CDR), nằm rải rác giữa các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi VH và VL cấu thành bởi ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết mà tương tác với một kháng nguyên. Các vùng ổn định của các kháng thể có thể do quá trình gắn kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc yếu tố của vật chủ gây ra, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào tác động) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ bổ thể thông thường.

"Mảnh gắn kết với IGF-1R" hoặc "mảnh gắn kết với kháng nguyên" của kháng thể theo sáng chế được sử dụng để chỉ peptit, polypeptit, hoặc protein bất kỳ có khả năng duy trì quá trình gắn kết với đích (nói chung cũng được gọi là kháng nguyên) của kháng thể.

Theo một phương án, "mảnh gắn kết với kháng nguyên" như vậy được chọn trong nhóm bao gồm Fv, scFv (sc đối với chuỗi đơn), Fab, $F(ab')_2$, Fab', mảnh hoặc kháng thể kép scFv-Fc, hoặc mảnh bất kỳ của các mảnh này mà thời gian bán thải có thể tăng lên bằng cách cải biến hóa học, như bổ sung poly(alkylen) glycol như poly(etylen) glycol ("PEGyl hóa") (các mảnh được gắn PEG được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG hoặc Fab'-PEG) ("PEG" đối với Poly(Etylen) Glycol), hoặc bằng cách đưa vào liposom, các mảnh này có ít nhất một trong số các CDR đặc trưng của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn nếu "mảnh gắn kết với kháng nguyên" này được cấu thành bởi hoặc

chứa một phần trình tự của chuỗi nặng hoặc nhẹ biến đổi của kháng thể mà từ đó chúng được tạo ra, một phần trình tự này là đủ để duy trì tính đặc hiệu gắn kết tương tự do kháng thể mà nó được tạo nên và có ái lực đủ, tốt hơn nếu ít nhất bằng 1/100, theo cách được ưu tiên hơn là ít nhất 1/10 ái lực của kháng thể mà nó được tạo nên, đối với đích. Tốt hơn nữa, nếu "mảnh gắn kết với kháng nguyên" này được cấu thành bởi hoặc chứa ít nhất ba CDR CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của chuỗi nặng biến đổi và ba CDR CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể mà chúng được tạo ra.

"Quá trình gắn kết", "gắn kết", hoặc thuật ngữ tương tự được dự định rằng kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, tạo ra phức chất với kháng nguyên là tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Khả năng gắn kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng $1x10^{-6}$ M hoặc nhỏ hơn. Các phương pháp để xác định xem liệu hai phân tử có gắn kết với nhau hay không là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, phương pháp thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự. Để tránh nghi ngờ, không có nghĩa rằng kháng thể này có thể không gắn kết hoặc gây cản trở, ở mức thấp, với kháng nguyên khác. Tuy nhiên, theo một phương án, kháng thể này chỉ gắn kết với kháng nguyên này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể IGF-1R" cần được giải thích theo cách tương tự với "kháng thể kháng IGF-1R" và có nghĩa là kháng thể có khả năng gắn kết với IGF-1R.

Theo một phương án, epitop của kháng thể được định vị vào miền ngoại bào của IGF-1R của người (còn được gọi là IGF-1R ECD).

Theo một phương án cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, có khả năng gắn kết với IGF-1R với EC_{50} nằm trong khoảng từ $10x10^{-10}$ đến $1x10^{-10}$, và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ $8x10^{-10}$ đến $2x10^{-10}$M.

Theo nghĩa này, "EC_{50}" được sử dụng để chỉ 50% nồng độ hữu hiệu. Chính xác hơn, thuật ngữ một nửa nồng độ hữu hiệu tối đa (EC_{50}) tương ứng với nồng độ của dược chất, kháng thể hoặc độc tố tạo ra một nửa đáp ứng nằm giữa mức nền và nồng độ tối đa sau thời gian tiếp xúc quy định nào đó. Nó thường được sử dụng làm thước đo hiệu lực của dược chất. Do đó, EC_{50} của đường cong đáp ứng liều gia tăng thể hiện nồng độ của hợp chất trong đó quan sát được hiệu quả tối đa của nó là 50%. EC_{50} của đường cong đáp ứng liều định lượng thể hiện nồng độ của hợp chất trong đó 50% quần thể có đáp ứng,

sau khoảng thời gian tiếp xúc quy định. Nồng độ đo được theo đường cong xích ma, tăng nhanh theo mức thay đổi tương đối nhỏ về nồng độ. Điều này có thể được xác định bằng cách toán học bởi phép lấy đạo hàm của đường tối ưu.

Theo phương án ưu tiên, EC_{50} được xác định theo sáng chế đặc trưng cho khả năng gắn kết kháng thể trên IGF-1R ECD tiếp xúc với các tế bào của khối u của người. Tham số EC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phân tích FACS. Tham số EC_{50} phản ánh nồng độ của kháng thể để thu được 50% khả năng gắn kết tối đa của nó trên IGF-1R của người được biểu hiện trên các tế bào của khối u người. Mỗi trị số EC_{50} được tính toán là trung điểm của đường cong đáp ứng liều bằng cách sử dụng chương trình khớp đường cong hồi quy bốn tham số (Phần mềm Prism). Tham số này được chọn làm đại diện cho các điều kiện sinh lý/bệnh lý.

Thuật ngữ "epitop" là vùng của kháng nguyên được gắn kết bởi protein gắn kết kháng nguyên, bao gồm các kháng thể. Epitop có thể được xác định dưới dạng epitop cấu trúc hoặc chức năng. Nói chung, epitop chức năng là tập hợp con của epitop cấu trúc và có các gốc mà góp phần trực tiếp vào ái lực tương tác. Các epitop cũng có thể là epitop cấu hình riêng, tức là các axit amin không phải mạch thẳng, nói cách khác epitop cấu thành bao gồm axit amin không chứa trình tự. Theo các phương án nhất định, epitop có thể bao gồm các yếu tố quyết định mà là các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin, các mạch bên của đường, các nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl, và, theo các phương án nhất định, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, và/hoặc đặc tính tích điện riêng.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R) và được nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R, phương pháp này bao gồm bước chọn lọc kháng thể:

i) gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, và

ii) không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 chứa axit amin không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 hoặc chứa axit aspartic (ASP) ở vị trí 491, tốt hơn nếu không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 chứa axit amin không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 và axit aspartic (ASP) ở vị trí 491.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R) và được nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R, phương pháp này bao gồm các bước: 1) chọn lọc kháng thể:

i) gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, và

ii) không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 chứa axit amin không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, hoặc với axit aspartic (ASP) ở vị trí 491, tốt hơn nếu không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 chứa axit amin không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 và axit aspartic (ASP) ở vị trí 491,

và, sau đó, từ kháng thể này,

2) chọn lọc kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết với IGF-1R của nó, mà tỷ lệ phần trăm nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R ít nhất là 40%, tốt hơn nếu ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R) và được nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R, phương pháp này bao gồm các bước:

1) chọn lọc kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết với IGF-1R của nó, mà tỷ lệ phần trăm nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R ít nhất là 40%, tốt hơn nếu ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%,

2) và, sau đó, từ kháng thể này, chọn lọc kháng thể:

i) gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, và

ii) không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 chứa axit amin không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, hoặc với axit aspartic (ASP) ở vị trí 491, tốt hơn nếu không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 chứa axit amin không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 và axit aspartic (ASP) ở vị trí 491.

Theo một phương pháp theo sáng chế, bước chọn lọc kháng thể khi các đặc tính tương tác nội bào hóa của nó và đặc tính gắn kết, hoặc không gắn kết, với IGF-1R có thể được thực hiện theo thứ tự không liên tục bất kỳ.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R), như thu được bởi một trong số các phương pháp nêu trên theo sáng chế.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 và được nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R, và không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.82 hoặc 92, tốt hơn nếu có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.82 và 92.

Đối với kháng thể theo sáng chế, SEQ ID NO.52 tương ứng với trình tự axit amin của Thụ thể IGF-1R của người, trong đó nó chứa histiđin ở vị trí 494, tức là IGF-1R kiểu hoang, trong khi đó SEQ ID NO.82 tương ứng với trình tự axit amin đột biến của Thụ thể IGF-1R của người, trong đó chứa arginin ở vị trí 494, và trong khi đó SEQ ID NO.92 tương ứng với trình tự axit amin đột biến của thụ thể IGF-1R của người, trong đó chứa alanin ở vị trí 491.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có ít nhất 8 axit amin.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit axit amin aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có ít nhất 8 axit amin.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 và axit amin axit aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có ít nhất 8 axit amin.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có ít nhất 8 axit amin, trong đó epitop này chứa trình tự axit amin được chọn trong nhóm bao gồm:

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 487 đến axit amin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 488 đến axit amin ở vị trí 495 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 489 đến axit amin ở vị trí 496 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 490 đến axit amin ở vị trí 497 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 491 đến axit amin ở vị trí 498 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 492 đến axit amin ở vị trí 499 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, và

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 493 đến axit amin ở vị trí 500 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin axit aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này bao gồm axit aspartic axit amin ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có ít nhất 8 axit amin, trong đó epitop này chứa trình tự axit amin được chọn trong nhóm bao gồm:

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 484 đến axit amin ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 485 đến axit amin ở vị trí 492 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 486 đến axit amin ở vị trí 493 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 487 đến axit amin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 488 đến axit amin ở vị trí 495 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 489 đến axit amin ở vị trí 496 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, và

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 490 đến axit amin ở vị trí 497 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 và axit aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 và axit aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, với epitop này chứa trình tự axit amin có ít nhất 8 axit amin, trong đó epitop này chứa trình tự axit amin được chọn trong nhóm bao gồm:

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 487 đến axit amin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 488 đến axit amin ở vị trí 495 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 489 đến axit amin ở vị trí 496 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52,

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 490 đến axit amin ở vị trí 497 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 và

- trình tự axit amin tương đồng với, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin từ axit amin ở vị trí 491 đến axit amin ở vị trí 498 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52:

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 và được nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R, và không gắn kết với IGF-1R có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.82, hoặc trong đó epitop của kháng thể nội bào hóa này chứa axit amin histiđin ở vị trí 494 và/hoặc axit amin axit aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52, trong đó tỷ lệ phần trăm nội bào hóa của kháng thể này sau khi nó gắn kết với IGF-1R ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, hoặc ít nhất là 80%. Tỷ lệ phần trăm nội bào hóa của kháng thể, hoặc của mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, như, ví dụ, phương pháp nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, theo sáng chế, trong đó axit amin này không phải histiđin ở vị trí 494 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 là arginin (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.82).

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể nội bào hóa, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, theo sáng chế, trong đó axit amin này không phải axit aspartic ở vị trí 491 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52 là alanin (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.92).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, mà gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin của người 1 (IGF-1R) và được nội bào hóa sau khi nó gắn kết với IGF-1R, trong đó kháng thể này được chọn từ:

i) kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng với CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, và ba vùng CDR chuỗi nhẹ với CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5;

ii) kháng thể cạnh tranh để gắn kết với IGF-1R với kháng thể nêu ở mục i); và

iii) kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop của IGF-1R là kháng thể nêu ở mục i).

Quá trình cạnh tranh để gắn kết với IGF-1R có thể được xác định bằng phương pháp hoặc kỹ thuật bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật liên quan đến hoạt tính phóng xạ, Biacore, ELISA, đo dòng tế bào, v.v., hoặc theo phương pháp như được nêu trong bản mô tả này.

Việc xác định quá trình gắn kết với cùng một epitop có thể được xác định bằng phương pháp hoặc kỹ thuật bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật liên quan đến phóng xạ, Biacore, ELISA, đo dòng tế bào, v.v., hoặc theo phương pháp như được nêu trong bản mô tả này.

Như nêu trên, và trái với sự hiểu biết thông thường, sáng chế tập trung vào các kháng thể IGF-1R đặc hiệu có khả năng nội bào hóa cao sau khi gắn kết với IGF-1R. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể mà "được nội bào hóa" hoặc "nội bào hóa" (hai cách thể hiện này là tương tự nhau) là kháng thể được đưa vào bởi (có nghĩa là nó "đi vào") tế bào khi gắn kết với IGF-1R trên tế bào của động vật có vú. Kháng thể như vậy là kháng thể đang được quan tâm do nó là một trong số các thành phần của thể tiếp hợp miễn dịch-dược chất, sao cho nó hướng tới hoặc nhằm đưa độc tố tế bào vào các tế bào đích, tốt hơn nếu các tế bào bệnh ung thư. Ngay khi nội bào hóa, độc tố tế bào sẽ gây chết tế bào bệnh ung thư.

Tốt hơn nếu các kháng thể theo sáng chế là toàn bộ các kháng thể có các trình tự tương tự đối với CDR-H2, CDR-H3 và CDR-L2, 3 CDR khác là khác nhau. Sự quan sát này dường như là phù hợp vì nó là một phần của hiểu biết chung rằng, liên quan đến tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể, CDR-H3 được mô tả là CDR quan trọng nhất và liên quan nhất đến việc nhận diện epitop.

Nhận thấy rằng chìa khóa quan trọng để thành công trong việc trị liệu bằng thể tiếp hợp miễn dịch là tính đặc hiệu kháng nguyên đích và quá trình nội bào hóa của phức

hợp protein gắn kết với kháng nguyên vào các tế bào bệnh ung thư. Rõ ràng là kháng nguyên không nội bào hóa là kém hữu hiệu hơn so với kháng nguyên nội bào hóa để phân phối dược chất gây độc tế bào. Các quá trình nội bào hóa biến đổi theo kháng nguyên và phụ thuộc vào nhiều tham số mà có thể bị ảnh hưởng bởi các kháng thể.

Trong thể tiếp hợp miễn dịch, dược chất gây độc tế bào có hoạt tính gây độc tế bào và kháng thể đã được sử dụng có tính đặc hiệu chống lại các tế bào bệnh ung thư, cũng như vectơ để đi vào các tế bào nhằm định hướng đúng dược chất gây độc tế bào. Do đó, để cải thiện thể tiếp hợp miễn dịch, kháng thể này có thể có khả năng nội bào hóa cao vào tế bào bệnh ung thư đích. Hiệu quả mà quá trình nội bào hóa do kháng thể gây ra là khác nhau đáng kể tùy thuộc vào epitop hướng đích. Việc chọn lọc các kháng thể IGF-1R nội bào hóa tiềm năng cần đến các nghiên cứu dữ liệu thử nghiệm khác nhau không những bao gồm quá trình điều hòa giảm IGF-1R mà còn theo quá trình nội bào hóa kháng thể IGF-1R với các tế bào.

Theo một phương án, quá trình nội bào hóa của kháng thể theo sáng chế có thể được đánh giá bằng cách phát huỳnh quang miễn dịch (như được minh họa bằng ví dụ sau trong bản mô tả này) hoặc phương pháp hoặc quy trình bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này riêng đối với cơ chế nội bào hóa.

Phức hợp IGF-1R/kháng thể được nội bào hóa sau khi gắn kết kháng thể vào ECD của IGF-1R này, tạo ra sự giảm số lượng IGF-1R ở bề mặt của các tế bào. Mức giảm này có thể được định lượng bằng phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này như, theo ví dụ không giới hạn phạm vị của sáng chế, phương pháp thấm tách Western, FACS, phát huỳnh quang miễn dịch và phương pháp tương tự.

Theo một phương án, sự giảm này, do đó phản ánh quá trình nội bào hóa, tốt hơn nếu có thể được đo bằng FACS và được biểu hiện bởi mức chênh lệch hoặc trị số đelta giữa cường độ phát huỳnh quang trung bình (Mean Fluorescence Intensity - MFI) đo được ở nhiệt độ 4°C với MFI đo được ở nhiệt độ 37°C sau 4 giờ ủ với kháng thể.

Theo một ví dụ không giới hạn, trị số đelta này được xác định trên cơ sở MFI thu được bởi các tế bào không được xử lý và các tế bào này được xử lý bằng kháng thể bằng cách sử dụng i) các tế bào bệnh ung thư vú MCF7 sau 4 giờ ủ với kháng thể đã nêu trong bản mô tả này và ii) kháng thể thứ cấp được đánh dấu bởi Alexa488. Tham số này được xác định khi tính toán theo công thức sau: $\Delta(MFI_{4°C} - MFI_{37°C})$.

Mức chênh lệch này giữa MFI phản ánh quá trình điều hòa giảm IGF-1R với các MFI là tỷ lệ với IGF-1R được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Theo một khía cạnh có lợi, các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, bao gồm kháng thể đơn dòng tạo ra $\Delta(MFI_{4°C} - MFI_{37°C})$ trên MCF7 ít nhất là 280, tốt hơn nếu ít nhất là 400.

Theo cách chi tiết hơn, trị số đelta nêu trên có thể được đo theo quy trình sau, cần phải xem là ví dụ minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế:

a) Xử lý và ủ các tế bào của khối u đáng quan tâm bằng kháng thể theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy hoàn toàn lạnh (4°C) hoặc ấm (37°C);

b) Xử lý các tế bào đã được xử lý ở bước a) và, đồng thời, điều trị các tế bào không được xử lý bằng kháng thể thứ cấp,

c) Đo MFI (đại diện cho số lượng IGF-1R có mặt ở bề mặt) đối với các tế bào đã được xử lý và không được điều trị bằng kháng thể đánh dấu thứ cấp có khả năng gắn kết với kháng thể theo sáng chế, và

d) Tính toán trị số đelta bằng cách lấy MFI thu được với các tế bào đã được xử lý trừ đi MFI thu được bằng các tế bào không được xử lý.

Từ trị số đelta MFI này, tỷ lệ nội bào hóa có thể được xác định bởi công thức:

$100x(MFI_{4°C} - MFI_{37°C})/MFI_{4°C}$

Các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, theo sáng chế, có mặt trên MCF7 có tỷ lệ nội bào hóa nằm trong khoảng từ 70% đến 90%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 87%.

Lợi ích cụ thể của các kháng thể nêu trong bản mô tả này dựa vào tốc độ nội bào hóa của chúng.

Nói chung, đã biết rằng đối với thể tiếp hợp miễn dịch, mong muốn rằng các kháng thể đã được sử dụng có tốc độ nội bào hóa nhanh, tốt hơn nếu trong vòng 24 giờ tính từ khi dùng kháng thể *in vivo* và, tốt hơn nữa là trong vòng 12 giờ và, tốt hơn nữa là trong vòng 6 giờ.

Theo sáng chế, tốc độ nội bào hóa, còn được gọi là việc giảm khả năng gắn kết của kháng thể với bề mặt tế bào hoặc sự phân hủy kháng thể trên bề mặt tế bào, được

biểu thị bằng t1/2 (thời gian bán thải) và tương ứng theo thời gian cần để thu được mức giảm là 50% ΔMFI (khía cạnh này cần được hiểu rõ ràng liên quan đến các ví dụ sau).

Theo cách đặc biệt có lợi, các kháng thể theo sáng chế có t1/2 nằm trong khoảng từ 5 đến 25 phút, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 20 phút.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO. và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa ba vùng CDR chuỗi nặng chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO., hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.; và ba vùng CDR chuỗi nhẹ chứa hoặc cấu thành bởi trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6.

Theo một phương án khác, kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, chứa ba vùng CDR chuỗi nặng chứa hoặc cấu thành bởi trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.; và ba vùng CDR chuỗi nhẹ chứa hoặc cấu thành bởi trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6.

Các vùng CDR là các vùng siêu biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch như được xác định bởi IMGT.

Hệ thống đánh số thứ tự duy nhất IMGT đã được xác định để so sánh các miền biến đổi dù là thụ thể kháng nguyên, loại chuỗi, hoặc loài [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. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. Trong hệ thống đánh số thứ tự duy nhất IMGT, axit amin được bảo toàn luôn có cùng một vị trí, ví dụ xystein 23 (CYS thứ nhất), tryptophan 41 (TRP được bảo toàn), axit amin kỵ nước 89, xystein 104 (CYS thứ hai), phenylalanin hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Hệ thống đánh số thứ tự

duy nhất IMGT đưa ra ranh giới tiêu chuẩn của vùng khung (FR1-IMGT: các vị trí 1 đến 26, FR2-IMGT: 39 đến 55, FR3-IMGT: 66 đến 104 và vùng FR4-IMGT: 118 đến 128) và của vùng xác định tính bổ trợ: CDR1-IMGT: 27 đến 38, CDR2-IMGT: 56 đến 65 và CDR3-IMGT: 105 đến 117. Đối với các khoảng trống đại diện cho các vị trí không bị bắt giữ, chiều dài CDR-IMGT (được thể hiện nằm giữa dấu ngoặc vuông và được tách nhau bằng dấu chấm, ví dụ [8.8.13]) tạo ra thông tin quyết định. Hệ thống đánh số thứ tự duy nhất IMGT được sử dụng trên hình đồ họa 2D, được thiết kế bởi IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], và trong cấu trúc 3D trong IMGT/3Dstructure -DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor an MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Cần phải hiểu rằng, không mâu thuẫn trong bản mô tả này, các vùng xác định tính bổ trợ hoặc CDR, có nghĩa là các vùng siêu biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch như được xác định theo hệ đánh số IMGT.

Tuy nhiên, CDR cũng có thể được xác định theo hệ đánh số Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, và các ấn phẩm tiếp theo). Có ba vùng CDR chuỗi nặng và ba vùng CDR chuỗi nhẹ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "CDR" và "các CDR" được sử dụng để biểu thị, tùy thuộc vào từng trường hợp, một hoặc nhiều, hoặc thậm chí toàn bộ các vùng chứa phần lớn các gốc axit amin tạo ra ái lực gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên hoặc epitop mà nó nhận diện. Để đơn giản hóa việc đọc bản mô tả này, các CDR theo Kabat là không được định nghĩa. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể biết được rõ ràng rằng việc sử dụng định nghĩa về CDR theo IMGT, nhằm xác định các CDR theo Kabat.

Theo sáng chế, "tỷ lệ phần trăm tương đồng" giữa hai trình tự của axit nucleic hoặc axit amin có nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc nucleotit hoặc axit amin giống nhau giữa hai trình tự cần được so sánh, thu được sau khi duỗi thẳng tối ưu, tỷ lệ phần trăm này là chỉ có ý nghĩa thống kê và sự khác nhau giữa hai trình tự được phân bố ngẫu nhiên dọc theo chiều dài của chúng. Việc so sánh hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được thực hiện theo cách thông thường bằng cách so sánh trình tự sau khi duỗi thẳng tối ưu các trình tự này, việc so sánh này có thể được thực hiện theo đoạn hoặc bằng cách sử

dụng "cửa sổ duỗi thẳng". Sự duỗi thẳng tối ưu của trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ngoài việc so sánh thủ công, bằng thuật toán tương đồng tại chỗ của Smith và Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán tương đồng tại chỗ của Neddleman và Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], bằng phương pháp nghiên cứu tương tự của Pearon và Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy tính có sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA và TFASTA trong gói phần mềm Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, hoặc bằng phần mềm so sánh BLAST NR hoặc BLAST P).

Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được duỗi thẳng tối ưu trong đó trình tự axit nucleic hoặc axit amin để so sánh có thể có các đoạn bổ sung hoặc khuyết đã được so sánh với trình tự so sánh để duỗi thẳng tối ưu giữa hai trình tự này. Tỷ lệ tương đồng được tính toán bằng cách xác định số lượng vị trí mà ở đó gốc axit amin hoặc nucleotit là giống nhau giữa hai trình tự, tốt hơn nếu giữa hai trình tự hoàn chỉnh, chia số vị trí giống nhau cho tổng số vị trí trong cửa sổ duỗi thẳng và nhân kết quả này với 100 để thu được tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự này.

Ví dụ, chương trình BLAST, "trình tự BLAST 2" (Tatusova et al., "BLAST 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250) hiện có trên trang điện tử http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html, có thể được sử dụng các tham số mặc định (nhất là đối với các tham số "điểm trừ khoảng trống hở": 5, và "điểm trừ khoảng trống kéo dài": 2; nền đã được chọn, ví dụ, là nền "BLOSUM 62" được gợi ý bởi chương trình này); tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự để so sánh được tính toán trực tiếp bằng chương trình này.

Đối với trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự axit amin so sánh, các ví dụ được ưu tiên bao gồm các trình tự chứa trình tự thay đổi, các cải biến nhất định, nhất là đoạn khuyết, bổ sung hoặc thế chứa ít nhất một axit amin, đoạn cắt ngắn hoặc kéo dài. Trong trường hợp thế một hoặc nhiều axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp, việc thế được ưu tiên trong đó các axit amin đã được thế được thay thế bằng các axit amin "tương đương". Trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit amin tương đương" có nghĩa là các axit amin bất kỳ có thể

được thế đối với một trong số các axit amin cấu trúc mà không làm cải biến hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và của các kháng thể nêu trong các ví dụ cụ thể nêu sau.

Axit amin tương đương có thể được xác định dựa trên mức độ tương đồng về cấu trúc của chúng với axit amin mà chúng được thế hoặc dựa trên kết quả của các thử nghiệm so sánh về hoạt tính sinh học giữa các protein gắn kết kháng nguyên khác nhau có thể được tạo ra.

Bảng 1 dưới đây là ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế tóm tắt các axit amin thế có thể có mặt cần được thực hiện mà không tạo ra các cải biến đáng kể về hoạt tính sinh học của protein gắn kết với kháng nguyên được cải biến tương ứng; các axit amin thế nghịch đảo có thể có tự nhiên trong cùng điều kiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Axit amin thế
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	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 một khía cạnh cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, không gắn kết với thụ thể insulin (IR). Khía cạnh này là khía cạnh đáng quan tâm do kháng thể được nêu trong bản mô tả này không bị ảnh hưởng tiêu cực bất kỳ tới IR, tức là quá trình chuyển hóa insulin.

Theo một phương án khác, vẫn theo khía cạnh có lợi khác, kháng thể theo sáng chế có khả năng gắn kết không những với IGF-1R của người mà còn với IGR-1R của khỉ,

và cụ thể hơn với IGF-1R của khỉ cynomolgus. Khía cạnh này cũng là khía cạnh đáng quan tâm do dễ thực hiện các thử nghiệm về độc tính và thử nghiệm lâm sàng.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế cấu thành bởi kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "Mab" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, tức là các kháng thể riêng rẽ của quần thể này là giống nhau chỉ khác là các đột biến có thể xuất hiện trong tự nhiên có thể có mặt với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng là kháng thể đặc hiệu cao, hướng tới một epitop. Kháng thể đơn dòng như vậy có thể được sản sinh bởi một dòng của tế bào B hoặc thể lai. Kháng thể đơn dòng cũng có thể là kháng thể tái tổ hợp, tức được tạo ra bởi kỹ thuật protein. Kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ thử nghiệm kháng thể thực khuẩn. Ngoài ra, trái với quá trình tạo ra kháng thể đa dòng mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau hướng tới các yếu tố quyết định, hoặc epitop khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng hướng tới một epitop của kháng nguyên. Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc thu được bằng cách tinh chế từ các nguồn tự nhiên hoặc thu được bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền hoặc tổng hợp hóa học.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng trong bản mô tả này bao gồm kháng thể của chuột, kháng thể thể khảm và kháng thể nhân tạo, như được mô tả sau.

Kháng thể có thể có nguồn gốc từ thể lai có nguồn gốc từ chuột đã được nộp vào Viện thu thập môi trường nuôi cấy vi sinh vật Pháp (CNCM, Viện Pasteur, Paris, Pháp), thể lai này thu được bằng cách dung hợp tế bào lá lách/tế bào lympho của chuột nhắt đã được tạo miễn dịch bằng Balb/C và các tế bào của dòng tế bào Sp 2/O-Ag 14 của u tuỷ.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế cấu thành bởi kháng thể tái tổ hợp. Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp" được sử dụng để chỉ kháng thể tạo ra từ việc biểu hiện ADN tái tổ hợp nằm trong các tế bào sống. Kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế thu được bằng cách sử dụng các phương pháp thử nghiệm về kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, là đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, tạo ra trình tự ADN không thể tìm được trong các vi sinh vật.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế cấu thành bởi kháng thể được tổng hợp hóa học.

Theo một phương án, kháng thể IGF-1R theo sáng chế cấu thành bởi kháng thể của chuột, sau đó được gọi là m[*tên của kháng thể*].

Theo một phương án, kháng thể IGF-1R cấu thành bởi kháng thể thể khảm, sau đó được gọi là c[*tên của kháng thể*].

Theo một phương án, kháng thể IGF-1R cấu thành bởi kháng thể nhân tạo, sau đó được gọi là hz[*tên của kháng thể*].

Để tránh nghi ngờ, trong bản mô tả sau, thuật ngữ "kháng thể IGF-1R" và "[*tên của kháng thể]*" là tương tự nhau và bao gồm (không được mô tả theo nghĩa đối lập) các dạng của chuột, thể khảm và nhân tạo của kháng thể IGF-1R và "[*tên của kháng thể]*" này. Nếu cần, tiền tố m- (chuột), c- (thể khảm) hoặc hz- (nhân tạo) được sử dụng.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

b) kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

c) kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.12; và

d) kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11.

Để làm rõ, bảng 2 sau minh họa các trình tự CDR, đã được xác định theo IMGT, đối với các kháng thể được ưu tiên.

Bảng 2

	Chuỗi nặng	**Chuỗi nhẹ**	**SEQ ID NO.**

Liên ứng	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5
		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 và 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiển nhiên hiểu được rằng dạng kết hợp bất kỳ của 6 CDR như nêu trên cần được coi là một phần của sáng chế.

Có thể quan sát được từ bảng 2 này, toàn bộ các kháng thể được mô tả trong bảng này có cùng một trình tự đối với CDR-H2, CDR-H3 và CDR-L2, đặc tính này là mối quan tâm cụ thể như nêu trên.

Một khía cạnh cụ thể đề cập đến kháng thể của chuột (m), hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên, khác biệt ở chỗ kháng thể này còn bao gồm các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể của loài khác loại với chuột nhắt, đặc biệt là người.

Khía cạnh cụ thể khác đề cập đến kháng thể thể khảm (c), hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên, khác biệt ở chỗ kháng thể này còn bao gồm các vùng ổn định của

chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể của loài khác loại với chuột nhắt, đặc biệt là người.

Theo một phương án theo sáng chế, kháng thể cấu thành bởi kháng thể thể khảm.

Kháng thể thể khảm là kháng thể chứa vùng biến đổi tự nhiên (chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) có nguồn gốc từ kháng thể của loài nhất định kết hợp với các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể của loài khác với loài nhất định này.

Các kháng thể, hoặc mảnh thể khảm của nó, có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, kháng thể thể khảm có thể được sản sinh bằng cách tách dòng ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu và trình tự mã hoá vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng không phải của người theo sáng chế, đặc biệt là chuột, và trình tự mã hoá vùng ổn định của kháng thể của người. Kháng thể thể khảm theo sáng chế được mã hóa bởi một gen tái tổ hợp như vậy có thể là, ví dụ, kháng thể thể khảm của chuột nhắt-người, tính đặc hiệu của kháng thể này cần được xác định bởi vùng biến đổi có nguồn gốc từ ADN của chuột và isotyp của nó được xác định bởi vùng ổn định có nguồn gốc từ người ADN.

Theo phương án ưu tiên, nhưng không bị giới hạn, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

b) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

c) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.12;

d) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11; và

e) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.17 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.17 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.12.

"Trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13 đến 17" được dự định dùng để tương ứng chỉ trình tự có ba vùng CDR chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO. và, ngoài ra, có ít nhất 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98%, tương đồng với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID NO.13 đến 17 nằm ngoài trình tự tương ứng với CDR (tức là SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.), trong đó "nằm ngoài trình tự tương ứng với CDR" được dự định để chỉ "trừ các trình tự tương ứng với các CDR".

Theo phương án ưu tiên, không bị giới hạn khác, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.19 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.19 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3;

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3;

d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.21 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.21 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3; và

e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.22 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.22 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3.

"Trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 đến 22" được dự định để chỉ trình tự có ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 và, ngoài ra, có có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID NO.18 đến 22 nằm ngoài trình tự tương ứng với CDR (tức là SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.18;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.19 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.19;

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20;

d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.21 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.21; và

e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.17 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.17 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.22 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.22.

Các kháng thể thể khảm nêu trong bản mô tả này có thể còn được đặc trưng bởi miền ổn định và, cụ thể hơn, các kháng thể thể khảm này có thể được chọn hoặc được thiết kế như, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD hoặc IgE. Tốt hơn nữa, nếu trong bản mô tả của sáng chế, các kháng thể thể khảm này là IgG1 hoặc IgG4.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể thể khảm chứa các miền biến đổi VH và VL như nêu trên ở dạng IgG1. Tốt hơn nữa, nếu kháng thể thể khảm này bao gồm miền ổn định đối với VH có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.43 và miền Kappa đối với VL có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.45.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể thể khảm chứa các miền biến đổi VH và VL như nêu trên ở dạng IgG4. Tốt hơn nữa, nếu kháng thể thể khảm này bao gồm miền ổn định đối với VH có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.44 và miền Kappa đối với VL có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.45.

Theo phương án ưu tiên, không bị giới hạn khác, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.23 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.23 và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28;

b) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.24 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.24 và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.29 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.29;

c) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.25 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.25 và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30;

d) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.26 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.26 và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.31 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.31; và

e) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27 và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.32 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.32.

Để làm rõ, bảng 3 sau tương ứng minh họa trình tự của VH và VL, đối với các kháng thể thể khảm được ưu tiên.

Bảng 3

	Chuỗi nặng	**Chuỗi nhẹ**	**SEQ ID NO.**
c208F2	Miền biến đổi (VH)		13
		Miền biến đổi (VL)	18
	Có chiều dài đầy đủ		23
		Có chiều dài đầy đủ	28
c212A11	Miền biến đổi (VH)		14
		Miền biến đổi (VL)	19
	Có chiều dài đầy đủ		24
		Có chiều dài đầy đủ	29
c214F8	Miền biến đổi (VH)		15
		Miền biến đổi (VL)	20
	Có chiều dài đầy đủ		25

		Có chiều dài đầy đủ	30
c219D6	Miền biến đổi (VH)		16
		Miền biến đổi (VL)	21
	Có chiều dài đầy đủ		26
		Có chiều dài đầy đủ	31
c213B10	Miền biến đổi (VH)		17
		Miền biến đổi (VL)	22
	Có chiều dài đầy đủ		27
		Có chiều dài đầy đủ	32

Theo khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân tạo, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể của người tương ứng là vùng lambđa hoặc kappa và vùng gamma-1, gamma-2 hoặc gamma-4.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể cấu thành bởi kháng thể nhân tạo.

"Kháng thể nhân tạo" có nghĩa là kháng thể chứa các vùng CDR có nguồn gốc từ kháng thể có nguồn gốc không phải của người, các phần khác của phân tử kháng thể có nguồn gốc từ một (hoặc một vài) kháng thể của người. Ngoài ra, một số gốc phân đoạn của khung (được gọi là FR) có thể được cải biến để duy trì ái lực gắn kết.

Kháng thể nhân tạo hoặc mảnh của nó có thể được điều chế bằng kỹ thuật đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Kháng thể nhân tạo này được ưu tiên để sử dụng chúng trong các phương pháp liên quan đến chẩn đoán hoặc ngăn ngừa *in vitro* và/hoặc điều trị *in vivo*. Các kỹ thuật nhân tạo khác, là cũng đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, như, ví dụ, kỹ thuật "ghép CDR" được mô tả bởi PDL trong các patent EP 0 451 216, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 hoặc US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 và US 5,693,761. Các Patent Mỹ 5,639,641 hoặc 6,054,297, 5,886,152 và 5,877,293 có thể cũng được đề cập.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, và khi được giải thích theo cách chi tiết hơn trong các ví dụ sau, trong bản mô tả này kháng thể cấu thành bởi hz208F2. Quá trình nhân tạo này cũng có thể được áp dụng cho phần kháng thể khác theo sáng chế.

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có:

i) CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3,

ii) FR1, FR2 và FR3 có nguồn gốc từ IGHV1-46*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.46), và

iii) FR4 có nguồn gốc từ IGHJ4*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.48).

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có:

i) CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11,

ii) FR1, FR2 và FR3 có nguồn gốc từ IGKV1-39*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.47), và

iii) FR4 có nguồn gốc từ IGKJ4*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.49).

Theo phương án ưu tiên, nhưng không bị giới hạn theo sáng chế, kháng thể bao gồm:

a) chuỗi nặng có vùng CDR-H1, vùng CDR-H2 và vùng CDR-H3 có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3, và vùng FR1, vùng FR2 và vùng FR3 có nguồn gốc từ IGHV1-46*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.46), và vùng FR4 có nguồn gốc từ IGHJ4*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.48); và

b) chuỗi nhẹ có CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11, và vùng FR1, vùng FR2 và vùng FR3 có nguồn gốc từ IGKV1-39*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.47), và vùng FR4 có nguồn gốc từ IGKJ4*01 dòng mầm của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.49).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35. Kháng thể nhân tạo này sau đây được gọi là hz208F2 ("Biến thể" hoặc "Var." 1).

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 trong đó trình tự SEQ ID NO.33 này bao gồm ít nhất 1 đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95.

Thuật ngữ "đột biến-ngược" hoặc "đột biến ngược" có nghĩa là sự đột biến hoặc thay thế gốc của người có mặt trong dòng phôi bởi gốc tương ứng ban đầu có mặt trong trình tự của chuột.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 trong đó trình tự SEQ ID NO.33 này chứa 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 hoặc 17 đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95.

Để làm rõ, bảng 4 sau minh họa các đột biến ngược được ưu tiên.

Bảng 4

Số axit amin	20	34	35	38	48	50	59	61
Chuột	M	I	Y	K	L	W	K	N
Người	V	M	H	R	M	I	S	A

Số axit amin	62	70	72	74	76	77	79	82	95
Chuột	E	L	A	K	S	N	A	F	F
Người	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, trong đó trình tự SEQ ID NO.35 này chứa ít nhất 1 đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 và 87.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, trong đó trình tự SEQ ID NO.35 này bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 và 87.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 trong đó trình tự SEQ ID NO.33 này chứa ít nhất 1 đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95; và

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, trong đó trình tự SEQ ID NO.35 này chứa ít nhất 1 đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 và 87.

Để làm rõ, bảng 5 sau minh họa các đột biến ngược được ưu tiên.

Bảng 5

Số axit amin	22	53	55	65	71	72	77	87
Chuột	S	R	H	R	Y	S	N	F
Người	T	S	Q	S	F	T	S	Y

Theo phương án này, kháng thể theo sáng chế chứa toàn bộ các đột biến ngược nêu trên và tương ứng với kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.34 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36. Kháng thể nhân tạo này sau đây được gọi là hz208F2 ("Biến thể" hoặc "Var." 3).

Theo một phương án khác, toàn bộ các dạng nhân tạo nằm trong khoảng từ biến thể 1 đến biến thể 3 cũng được bao hàm bởi sáng chế. Mặt khác, kháng thể theo sáng chế tương ứng với kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự "liên ứng" SEQ ID NO.41 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự "liên ứng" SEQ ID NO.42. Thông thường, kháng thể nhân tạo này sau đây được gọi là hz208F2 ("Biến thể" hoặc "Var." 2).

Theo phương án ưu tiên, nhưng không bị giới hạn, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.34 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.34 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11; và

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất

kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, SEQ ID NO.62, SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.66, SEQ ID NO.68, SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.72, SEQ ID NO.74, SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.78, SEQ ID NO.80; và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11.

"Trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33, 34, 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80" được dự định để chỉ trình tự có ba vùng CDR chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO. và, ngoài ra, có ít nhất 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98%, tương đồng với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.56, SEQ ID NO.62, SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.66, SEQ ID NO.68, SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.72, SEQ ID NO.74, SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.78, SEQ ID NO. 80 nằm ngoài trình tự tương ứng với CDR (tức là các SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.).

Theo phương án ưu tiên, nhưng không bị giới hạn, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3; và

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36 và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3; và

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 và SEQ ID NO.60 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 hoặc 60; và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3.

"Trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, 36, 57 hoặc 60" được dự định để chỉ trình tự có ba vùng CDR chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6 và, ngoài ra, có ít nhất 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98%, tương đồng với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.57 hoặc SEQ ID NO.60 nằm ngoài trình tự tương ứng với CDR (tức là các SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6).

Kháng thể nhân tạo nêu trong bản mô tả này có thể còn được đặc trưng bởi miền ổn định và, cụ thể hơn, kháng thể nhân tạo này có thể được chọn hoặc được thiết kế như, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD hoặc IgE. Tốt hơn nữa, nếu trong bản mô tả của sáng chế, kháng thể nhân tạo này là IgG1 hoặc IgG4.

Sáng chế đề cập đến kháng thể nhân tạo chứa các miền biến đổi VH và VL như nêu trên ở dạng IgG1. Tốt hơn nữa, nếu kháng thể nhân tạo này chứa miền ổn định đối với VH có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.43 và miền Kappa đối với VL có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.45.

Sáng chế đề cập đến kháng thể nhân tạo chứa các miền biến đổi VH và VL như nêu trên ở dạng IgG4. Tốt hơn nữa, nếu kháng thể nhân tạo này chứa miền ổn định đối với VH có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.44 và miền Kappa đối với VL có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.45.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được chọn từ:

a) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.37 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.37 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.39 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.39;

b) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.38 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.38 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.40 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.40; và

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57, 60 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 hoặc 60. Để làm rõ, bảng 6a sau minh họa ví dụ không giới hạn về trình tự của VH và VL đối với biến thể 1 (Var. 1) và biến thể 3 (Var. 3) của kháng thể nhân tạo hz208F2. Nó còn bao gồm trình tự liên ứng đối với biến thể 2 (Var. 2).

Bảng 6a

	Chuỗi nặng	**Chuỗi nhẹ**	**SEQ ID NO.**
hz208F2 (var. 1)	Miền biến đổi (VH)		33
		Miền biến đổi (VL)	35
	Có chiều dài đầy đủ		37
		Có chiều dài đầy đủ	39
hz208F2 (Var. 3)	Miền biến đổi (VH)		34
		Miền biến đổi (VL)	36
	Có chiều dài đầy đủ		38
		Có chiều dài đầy đủ	40
hz208F2 (Var. 2)	Miền biến đổi (VH)		41
		Miền biến đổi (VL)	42

Theo phương án ưu tiên, không bị giới hạn khác, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80; và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 và SEQ ID NO.60 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 hoặc 60; và ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3; và

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 và SEQ ID NO.60 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 hoặc 60; và miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được chọn từ kháng thể chứa hoặc cấu thành bởi:

a) chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các SEQ ID NO.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 và 81 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 hoặc 81; và

b) chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ các SEQ ID NO.59 và 61 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59 hoặc 61. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được chọn từ: a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80; và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.57; và

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.68 và SEQ ID NO.78 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.56, SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.78 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.60 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.60

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được chọn từ:

a) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.58 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.58 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

b) kháng thể chứa hoặc cấu thành bởi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.58 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.58 và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.61 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.61;

c) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.63 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.63 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

d) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.65 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.65 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

e) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.65 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.65 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.61 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.61;

f) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.67 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.67 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

g) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.69 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.69 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

h) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.69 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.69 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.61 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.61;

i) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.71 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.71 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

j) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.73 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.73 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

k) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.75 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.75 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

l) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.77 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.77 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

m) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.79 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.79 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59;

n) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.79 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.79 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.61 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.61; và

o) kháng thể chứa, hoặc cấu thành bởi, chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.81 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.81 và chuỗi nhẹ chứa, hoặc cấu thành bởi, trình tự SEQ ID NO.59 hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.59.

Để làm rõ, bảng 6b sau minh họa ví dụ không giới hạn về trình tự của VH và VL (miền biến đổi và có chiều dài đầy đủ) đối với các biến thể khác nhau của kháng thể nhân tạo hz208F2.

Bảng 6b

	Chuỗi nặng	**Chuỗi nhẹ**	**SEQ ID NO.**
hz208F2 H037/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	56 57 58 59
Hz208F2 H037/L021	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	56 60 58 61
Hz208F2 H047/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	62 57 63 59
Hz208F2 H049/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	64 57 65 59
Hz208F2 H049/L021	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	64 60 65

			61
Hz208F2 H051/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	66 57 67 59
Hz208F2 H052/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	68 57 69 59
Hz208F2 H052/L021	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	68 60 69 61
Hz208F2 H057/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	70 57 71 59
Hz208F2 H068/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	72 57 73 59
Hz208F2 H070/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	74 57 75 59
Hz208F2 H071/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	76 57 77 59
Hz208F2 H076/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	78 57 79 59
Hz208F2 H076/L021	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	78 60 79 61
Hz208F2 H077/L018	Miền biến đổi (VH) Có chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL) Có chiều dài đầy đủ	80 57 81 59

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được chọn từ:

i) kháng thể được sản sinh bởi thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 hoặc I-4774 được lưu giữ Ngân hàng giống tế bào và sinh vật Pháp, Viện Pasteur, 25, đường Docteur Roux, 75724 Paris, Pháp tương ứng vào ngày 30 tháng 5 năm 2013, 26 tháng 6 năm 2013, 26 tháng 6 năm 2013, 24 tháng 4 năm 2013 và 26 tháng 6 năm 2013,

ii) kháng thể cạnh tranh để gắn kết với IGF-1R với kháng thể nêu ở mục i); và

iii) kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop của IGF-1R như kháng thể nêu ở mục i).

Theo theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể lai của chuột được chọn từ thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 và I-4774 được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur Pháp tương ứng vào ngày 30 tháng 5 năm 2013, 26 tháng 6 năm 2013, 26 tháng 6 năm 2013, 24 tháng 4 năm 2013 và 26 tháng 6 năm 2013.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập mã hoá kháng thể, hoặc đối với mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế.

Thuật ngữ "axit nucleic", "trình tự nucleic", "trình tự axit nucleic", "polynucleotit", "oligonucleotit", "trình tự polynucleotit" và "trình tự nucleotit", được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả này, có nghĩa là trình tự chính xác của các nucleotit, được cải biến hoặc không được cải biến, xác định mảnh hoặc vùng của axit nucleic, chứa nucleotit không có trong tự nhiên hoặc không chứa, và là ADN sợi kép, ADN sợi đơn hoặc các sản phẩm phiên mã của các ADN này.

Trình tự theo sáng chế được phân lập và/hoặc được tinh chế, nghĩa là, chúng được lấy mẫu trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ bằng cách sao chép, môi trường của chúng được cải biến ít nhất một phần. Axit nucleic phân lập thu được bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, bằng các cách, ví dụ, tế bào của vật chủ, hoặc thu được bằng cách tổng hợp hóa học cũng được nêu trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến vectơ chứa axit nucleic mã hoá kháng thể, hoặc đối với mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến vectơ tách dòng và/hoặc vectơ biểu hiện chứa trình tự nucleotit này.

Tốt hơn nếu các vectơ chứa các yếu tố cho phép biểu hiện và/hoặc tiết trình tự nucleotit trong tế bào của vật chủ nhất định. Do đó, vectơ cần chứa gen khởi đầu, tín hiệu bắt đầu và kết thúc dịch mã, cũng như các vùng điều hòa quá trình phiên mã thích hợp. Cần phải duy trì theo cách thích hợp trong tế bào vật chủ và có thể tuỳ ý có các tín hiệu đặc hiệu mô tả quá trình tiết của protein đã được dịch mã. Các yếu tố khác nhau này được chọn và được tối ưu hóa bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này theo tế bào của vật chủ đã dùng. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit có thể được cài xen vào các vectơ tự sao chép trong vật chủ đã chọn hoặc là vectơ hợp nhất của vật chủ đã chọn.

Các vectơ này được tạo ra bằng các phương pháp thông thường đã được sử dụng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và các dòng thu được có thể được đưa vào vật chủ thích hợp bằng các phương pháp tiêu chuẩn như phương pháp chuyển nhiễm liposom, xung điện, sốc nhiệt hoặc phương pháp hóa học.

Các vectơ là, ví dụ, vectơ có nguồn gốc plasmit hoặc virut. Chúng được sử dụng để biến nạp tế bào của vật chủ để tách dòng hoặc biểu hiện trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào phân lập của vật chủ được biến nạp bằng cách hoặc chứa vectơ như nêu trên.

Tế bào của vật chủ có thể được chọn trong hệ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình như tế bào của vi khuẩn, ví dụ, mà còn là tế bào nấm men hoặc tế bào của động vật, đặc biệt là tế bào của động vật có vú (ngoại trừ là người). Tế bào của côn trùng hoặc thực vật cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến động vật, không phải người, mà có tế bào đã được biến nạp.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước sau:

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

b) thu hồi kháng thể, hoặc một trong số các mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, từ đó tạo ra được từ môi trường nuôi cấy hoặc từ các tế bào đã được nuôi cấy này.

Các tế bào đã được biến nạp là các tế bào được sử dụng trong các phương pháp điều chế kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế. Các phương pháp điều chế kháng thể ở dạng tái tổ hợp bằng cách sử dụng vectơ và/hoặc tế bào đã được biến nạp bởi vectơ theo sáng chế, được bao hàm trong bản mô tả này. Tốt hơn nếu tế bào đã được biến nạp bởi vectơ như nêu trên được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu hiện kháng thể này và thu hồi kháng thể này.

Như đã nêu trên, tế bào của vật chủ có thể được chọn trong hệ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Cụ thể, có thể xác định được trình tự nucleotit dễ

tiết trong hệ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Do đó, vectơ theo sáng chế chứa trình tự này có thể được sử dụng theo cách có lợi để sản sinh ra các protein tái tổ hợp cần tiết. Thực vậy, quy trình tinh chế các protein tái tổ hợp đáng quan tâm này được thực hiện theo cách có lợi dựa trên thực tế rằng chúng có mặt trong dịch nổi trên bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào chứ không phải là nằm trong tế bào của vật chủ.

Kháng thể cũng có thể được điều chế bằng cách tổng hợp hóa học. Một phương pháp điều chế như vậy cũng là đối tượng của sáng chế. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này đã biết các phương pháp tổng hợp hóa học, như kỹ thuật pha rắn hoặc kỹ thuật pha rắn một phần, bằng cách ngưng tụ các mảnh hoặc bằng cách tổng hợp thông thường trong dung dịch. Polypeptit thu được bằng cách tổng hợp hóa học và có khả năng chứa axit amin không có trong tự nhiên tương ứng là cũng bao hàm trong sáng chế.

Kháng thể, hoặc mảnh gắn kết bất kỳ với kháng nguyên của nó, có thể thu được bằng phương pháp được nêu trên là cũng bao hàm trong sáng chế.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, như nêu trên để dùng làm chất dẫn thuốc định hướng để phân phối dược chất gây độc tế bào ở vị trí đích của vật chủ, vị trí đích của vật chủ này cấu thành bởi epitop nằm trong IGF-1R, tốt hơn nếu miền ngoại bào IGF-1R, tốt hơn nữa là IGF-1R của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.50) và còn tốt hơn nữa là miền ngoại bào IGF-1R của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.51), và còn tốt hơn nữa là đầu N của miền ngoại bào IGF-1R của người (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.52), hoặc biến thể trình tự tự nhiên bất kỳ của nó.

Theo một phương án ưu tiên, vị trí đích của vật chủ này là vị trí đích của tế bào của động vật có vú, tốt hơn nữa là tế bào của người, tốt hơn nữa là các tế bào tự nhiên hoặc bằng cách tái tổ hợp di truyền, biểu hiện IGF-1R.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa kháng thể, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó, như nêu trên, được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào.

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào.

Thuật ngữ "thể tiếp hợp miễn dịch" hoặc "miễn dịch-thể tiếp hợp" thường dùng để chỉ hợp chất chứa ít nhất một sản phẩm định hướng, như kháng thể, được liên kết vật lý với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu, từ đó tạo ra hợp chất hướng đích ở mức cao.

Theo một phương án ưu tiên, các tác nhân trị liệu như vậy bao gồm dược chất gây độc tế bào.

"Dược chất gây độc tế bào" hoặc "gây độc tế bào" được dự định dùng để chỉ chất khi được sử dụng cho đối tượng, điều trị hoặc ngăn ngừa sự phát triển của quá trình tăng sinh bất thường của tế bào, tốt hơn nếu sự phát triển của bệnh ung thư trong cơ thể của đối tượng, bằng cách ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng tế bào và/hoặc gây chết tế bào.

Nhiều dược chất gây độc tế bào được phân lập hoặc được tổng hợp và làm cho nó có khả năng ức chế quá trình tăng sinh của tế bào, hoặc để phá hủy hoặc làm giảm, nếu không rõ ràng, ít nhất các tế bào của khối u một cách đáng kể. Tuy nhiên, hoạt tính gây độc của các chất này không chỉ giới hạn ở các tế bào của khối u, và các tế bào không chứa khối u cũng bị ảnh hưởng và có thể bị phá hủy. Cụ thể hơn, các tác dụng phụ quan sát được ở các tế bào thay mới một cách nhanh chóng, như tế bào tạo máu hoặc các tế bào của biểu mô, cụ thể là màng nhầy. Bằng cách minh họa, các tế bào của đường dạ dày ruột bị ảnh hưởng đáng kể khi sử dụng dược chất gây độc tế bào này.

Một trong số các mục đích của sáng chế cũng có thể tạo ra dược chất gây độc tế bào để có thể giới hạn được các tác dụng phụ trên các tế bào bình thường đồng thời đồng thời duy trì được độc tính tế bào ở mức cao trên các tế bào của khối u.

Cụ thể hơn, tốt hơn nếu dược chất gây độc tế bào có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dược chất (tức là "thể tiếp hợp kháng thể-dược chất"), độc tố (tức là "độc tố miễn dịch" hoặc "thể tiếp hợp kháng thể-độc tố"), chất đồng vị phóng xạ (tức là "thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ" hoặc "thể tiếp hợp kháng thể-chất đồng vị phóng xạ"), v. v...

Theo phương án ưu tiên thứ nhất, thể tiếp hợp miễn dịch cấu thành bởi kháng thể được liên kết với ít nhất dược chất hoặc thuốc. Thể tiếp hợp miễn dịch như vậy được gọi là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (hoặc "ADC").

Theo một phương án thứ nhất, các dược chất như vậy có thể được mô tả liên quan đến cách thức tác động của chúng. Ví dụ không giới hạn có thể đề cập đến chất alkyl hóa

như mù tạc nitơ, alkyle-sulfonat, nitrosoure, oxazophorin, aziriđin hoặc imin-etylen, chất chống chuyển hóa, chất kháng sinh chống tạo khối u, chất ức chế quá trình phân bào, chất ức chế chức năng tạo nhiễm sắc, chất chống tạo mạch, chất kháng estrogen, chất kháng anđrogen, chất càng hóa, chất kích thích hấp thu sắt, chất ức chế xycloxygenaza, chất ức chế phosphođiesteraza, chất ức chế ADN, chất ức chế tổng hợp ADN, chất kích thích quá trình gây chết tế bào, chất ức chế thymiđylat, chất ức chế tế bào T, chất chủ vận interferon, chất ức chế robonucleosit triphosphat ređuctaza, chất ức chế aromataza, chất đối kháng thụ thể estrogen, chất ức chế tyrosin kinaza, chất ức chế chu trình tế bào, taxan, chất ức chế tubulin, chất ức chế sự tạo mạch, chất kích thích đại thực bào, chất đối kháng thụ thể neurokinin, chất chủ vận thụ thể cannabinoid, chất chủ vận thụ thể đopamin, chất chủ vận yếu tố kích thích bạch cầu hạt, chất chủ vận thụ thể erythropoietin, chất chủ vận thụ thể somatostatin, chất chủ vận LHRH, chất nhạy với canxi, chất đối kháng thụ thể VEGF, chất đối kháng thụ thể intơleukin, chất ức chế tế bào hủy xương, chất kích thích tạo gốc, chất đối kháng thụ thể enđothelin, Vinca alkaloit, chất kháng hormon hoặc chất điều biến miễn dịch hoặc dược chất mới khác bất kỳ đáp ứng được tiêu chuẩn về hoạt tính của dược chất gây độc tế bào hoặc độc tố.

Các dược chất như vậy là, ví dụ, được đề cập trong VIDAL 2010, ở trang liên quan đến các hợp chất được gắn vào cột về bệnh ung thư và máu "dược chất gây độc tế bào", các hợp dược chất gây độc tế bào này được đề cập trong tài liệu này bằng cách viện dẫn là dược chất gây độc tế bào được ưu tiên.

Cụ thể hơn, nhưng không chỉ giới hạn ở, dược chất hoặc thuốc được ưu tiên sau đây theo sáng chế: mecloetamine, chlorambucol, melphalen, chlorydrate, pipobromen, prednimustin, disodic-phosphat, estramustine, xyclophosphamit, altretamine, trofosfamit, sulfofosfamit, ifosfamit, thiotepa, trietylenamine, altetramine, carmustine, streptozocin, fotemustin, lomustine, busulfan, treosulfan, improsulfan, dacarbazine, cis-platin, oxaliplatin, lobaplatin, heptaplatin, miriplatin hyđrat, carboplatin, metotrexate, pemetrexed, 5-fluoruracil, floxuridine, 5-flodeoxyuridine, capecitabine, xytarabin, fludarabine, xytosin arabinoside, 6-mercaptopurin (6-MP), nelarabine, 6-thioguanin (6-TG), clođesoxyađenosin, 5-azaxytiđin, gemcitabine, cladribine, deoxycoformycin, tegafur, pentostatin, đoxorubixin, daunorubicin, idarubicin, valrubicin, mitoxantrone, dactinomycin, mithramycin, plicamycin, mitomycin C, bleomycin, procarbazine, paclitaxel, đoxetaxel, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine, topotecan,

irinotecan, etoposide, valrubicin, amrubicin hyđroclorua, pirarubicin, elliptinium axetat, zorubicin, epirubicin, idarubicin và teniposide, razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, thalidomide, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamine, endostatin, SU5416, SU6668, interferon-alpha, EMD121974, interleukin-12, IM862, angiostatin, tamoxifen, toremifene, raloxifene, droloxifene, iodoxyfene, anastrozole, letrozole, exemestane, flutamit, nilutamit, sprironolacton, cyproterone axetat, finasteride, cimitidine, bortezomid, Velcade, bicalutamit, cyproterone, flutamit, fulvestran, exemestane, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib, retinoid, rexinoid, metoxsalene, metylaminolevulinate, aldesleukine, OCT-43, denileukin diflitox, interleukin-2, tasonermine, lentinan, sizofilan, roquinimex, pidotimod, pegademase, thymopentine, poly I:C, procodazol, Tic BCG, corynebacterium parvum, NOV-002, ukrain, levamisole, 1311-chTNT, H-101, celmoleukin, interferon alfa2a, interferon alfa2b, interferon gamma1a, interleukin-2, mobenakin, Rexin-G, teceleukin, aclarubicin, actinomycin, arglabin, asparaginase, carzinophilin, chromomycin, daunomycin, leucovorin, masoprocol, neocarzinostatin, peplomycin, sarkomycin, solamargine, trabectedin, streptozocin, testosteron, kunecatechins, sinecatechins, alitretinoin, belotecan hydrocholoride, calusterone, dromostanolone, elliptinium axetat, ethinyl estrađiol, etoposide, fluoxymesterone, formestane, fosfetrol, goserelin axetat, hexyl aminolevulinate, histrelin, hyđroxyprogesterone, ixabepilone, leuprolide, medroxyprogesterone axetat, megesterol axetat, metylprednisolone, metyltestosteron, miltefosine, mitobronitol, nadrolone phenylpropionat, norethindrone axetat, prednisolone, prednisone, temsirrolimus, testolacton, triamconolone, triptorelin, vapreotide axetat, zinostatin stimalamer, amsacrine, arsen trioxide, bisantrene hyđroclorua, clorambuxil, chlortrianisene, cis-diamminđicloplatinium, xyclophosphamit, đietylstilbestrol, hexametylmelamine, hyđroxyurea, lenalidomide, lonidamine, mechlorethanamine, mitotane, nedaplatin, nimustine hyđroclorua, pamidronate, pipobroman, porfimer natri, ranimustine, razoxane, semustine, sobuzoxane, mesylat, trietylenmelamine, axit zoledronic, camostat mesylat, fadrozole HCl, nafoxidine, aminoglutethimide, carmofur, clofarabine, xytosin arabinoside, decitabine, doxifluridine, enocitabine, fludarabne phosphat, bột mìaxil, ftorafur, uraxil mustard, abarelix, bexarotene, raltiterxed, tamibarotene, temozolomide, vorinostat, megastrol,

clodronate đinatri, levamisole, ferumoxytol, sắt isomaltoside, celecoxib, ibudilast, bendamustine, altretamine, mitolactol, temsirolimus, pralatrexate, TS-1, decitabine, bicalutamit, flutamit, letrozole, clodronate đinatri, degarelix, toremifene xitrat, histamine đihyđrochloride, DW-166HC, nitracrine, decitabine, irinoteacn hyđroclorua, amsacrine, romidepsin, tretinoin, cabazitaxel, vandetanib, lenalidomide, ibandronic axit, miltefosine, vitespen, mifamurtide, nadroparin, granisetron, ondansetron, tropisetron, alizapride, ramosetron, dolasetron mesilate, fosaprepitant đimeglumine, nabilone, aprepitant, dronabinol, TY-10721, lisuride hyđro maleat, epiceram, defibrotide, dabigatran etexilate, filgrastim, pegfilgrastim, reditux, epoetin, molgramostim, oprelvekin, sipuleucel-T, M-Vax, axetyl L-carnitine, donepezil hyđroclorua, axit 5-aminolevulinic, metyl aminolevulinate, cetrorelix axetat, icođextrin, leuprorelin, metbylphenidate, octreotide, amlexanox, plerixafor, menatetrenone, anetole đithiolethione, doxercalciferol, cinacalcet hyđroclorua, alefacept, romiplostim, thymoglobulin, thymalfasin, ubenimex, imiquimod, everolimus, sirolimus, H-101, lasofoxifene, trilostane, incadronate, gangliosides, pegaptanib octanatri, vertoporfin, axit minodronic, axit zoledronic, gali nitrat, alendronate natri, etidronate đinatri, đinatri pamidronate, dutasteride, natri stibogluconat, armodafinil, dexrazoxane, amifostin, WF-10, temoporfin, darbepoetin alfa, ancestim, sargramostim, palifermin, R-744, nepidermin, oprelvekin, denileukin diftitox, crisantaspase, buserelin, deslorelin, lanreotide, octreotide, pilocarpine, bosentan, calicheamicin, maytansinoids, ciclonicate và pyrolobenzodiazepine, đặc biệt là các chất được bộc lộ trong đơn PCT được công bố với số WO2011/130598.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch cấu thành bởi kháng thể được liên kết với ít nhất một chất đồng vị phóng xạ. Thể tiếp hợp miễn dịch này được gọi là thể tiếp hợp kháng thể-chất đồng vị phóng xạ (hoặc "ARC").

Để phá hủy chọn lọc khối u, kháng thể này có thể chứa nguyên tử phóng xạ ở mức cao. Nhiều chất đồng vị phóng xạ là có sẵn để sự sản sinh ARC như, nhưng không chỉ giới hạn ở, At^{211}, C^{13}, N^{15}, O^{17}, Fl^{19}, I^{123}, I^{131}, I^{125}, In^{111}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, $tc^{99}m$, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, chất đồng vị phóng xạ Lu, gađolin, mangan hoặc sắt.

Phương pháp hoặc quy trình bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để đưa chất đồng vị phóng xạ này trong ARC. Ví dụ không giới hạn là $tc^{99}m$ hoặc I^{123}, Re^{186}, Re^{188} và In^{111} có thể được gắn qua gốc xystein.

Y^{90} có thể được gắn qua gốc lysin. I^{123} có thể được gắn vào bằng cách sử dụng phương pháp IODOGEN.

Một vài ví dụ có thể được đề cập để minh họa cho hiểu biết của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực về ARC như Zevalin® là ARC bao gồm kháng thể đơn dòng kháng CD20 và chất đồng vị phóng xạ In^{111} hoặc Y^{90} đã được gắn kết bởi chất càng hóa liên kết thioure; hoặc Mylotarg® bao gồm kháng thể kháng CD33 được liên kết với calicheamicin, (US 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). Gần đây, cũng có thể đề cập đến ADC được gọi là Adcetris (tương ứng Brentuximab vedotin) gần đây được chấp nhận bởi FDA để điều trị bệnh u bạch huyết Hodgkin.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch cấu thành bởi kháng thể được liên kết với ít nhất một độc tố. Thể tiếp hợp miễn dịch này được gọi là thể tiếp hợp kháng thể-độc tố (hoặc "ATC").

Độc tố là độc tố hữu hiệu và đặc hiệu được sản sinh bởi sinh vật sống. Chúng thường bao gồm chuỗi axit amin có thể biến đổi theo phân tử lượng giữa cặp gồm hàng trăm (peptit) và một trăm nghìn (các protein). Chúng cũng có thể là hợp chất hữu cơ phân tử nhỏ. Độc tố được tạo ra bởi nhiều vi sinh vật, ví dụ, vi khuẩn, nấm, tảo và thực vật. Nhiều sinh vật trong số chúng có tính cực độc, với độc tính có tính độc lớn hơn so với các chất thần kinh.

Độc tố được sử dụng trong ATC có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, toàn bộ các loại độc tố có thể tạo ra tác dụng gây độc tế bào của chúng theo các cơ chế bao gồm gắn kết tubulin, gắn kết ADN, hoặc chất ức chế topoisomeraza.

Độc tố có hoạt tính enzym và các mảnh của nó có thể được sử dụng bao gồm chuỗi điphtheria A, các mảnh hoạt tính không gắn kết của độc tố diphtheria, chuỗi ngoại độc tố A (từ Pseudomonas aeruginosa), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modecxin A, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein đianthin, các protein Phytolaca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và các tricothecene.

Các độc tố phân tử nhỏ, như dolastatin, auristatin, đặc biệt là monometylauristatin E (MMAE), trichothecene, và CC1065, và các dẫn xuất của các độc tố này có hoạt tính gây độc, là cũng được dự định trong bản mô tả này. Đã biết rằng dolastatin và auristatin có ảnh hưởng tới động lực của vi ống, thủy phân GTP, và phân chia nhân và tế bào và có hoạt tính chống bệnh ung thư và chống nấm.

"Chất liên kết", "đơn vị liên kết", hoặc "liên kết" có nghĩa là gốc hóa học chứa liên kết cộng hoá trị hoặc chuỗi gồm các nguyên tử gắn kết cộng hóa trị giữa kháng thể với ít nhất một dược chất gây độc tế bào.

Chất liên kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều chất ngẫu hợp protein hai chức như N-sucxinimiđyl-3-(2-pyriđylđithio) propionat (SPDP), sucxinimiđyl-4-(N-maleimiđometyl)xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của các imiđoeste (như đimetyl ađipimiđat HCl), các este hoạt tính (như đisucxinimiđyl suberat), alđehyt (như glutaralđehyt), các hợp chất bis-aziđo (như bis (p-aziđobenzoyl) hexanđiamin), dẫn xuất bis-điazo (như bis-(p-điazoniumbenzoyl)-etylenđiamin), điizoxyanat (như toluen 2,6-điizoxyanat), và các hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-điflo-2,4-đinitrobenzen). Axit1-isothioxyanatobenzyl-3-metylđietylen triaminepenta axetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất càng hóa được minh họa bằng ví dụ để tiếp hợp các chất độc tố tế bào với hệ định hướng. Các chất phản ứng liên kết ngang khác có thể là BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (sucxinimiđyl-(4-vinylsulfon)benzoat) là đang có trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.A).

Chất liên kết có thể là chất "không phân cắt được" hoặc "phân cắt được".

Theo một phương án ưu tiên, nó bao gồm quá trình giải phóng dược chất gây độc tế bào trong tế bào theo cách có lợi cho "liên kết có thể phân cắt được". Ví dụ, liên kết không bền với axit, liên kết nhạy với peptiđaza, liên kết không bền với ánh sáng, liên kết đimetyl hoặc liên kết đisulfua có thể được sử dụng. Theo một phương án ưu tiên, liên kết này có thể phân cắt được trong các điều kiện nội bào, sao cho quá trình phân cắt liên kết giải phóng dược chất gây độc tế bào từ kháng thể trong môi trường nội bào.

Ví dụ, theo một số phương án, liên kết có thể phân cắt được bằng chất phân cắt có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, trong lysosom hoặc nội thể hoặc caveolea). Liên kết này có thể là, ví dụ, liên kết peptiđyl được phân giải bởi peptiđaza nội bào hoặc enzym proteaza, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lysosomal hoặc endosomal proteaza. Thông thường, liên kết peptiđyl có ít nhất hai axit amin hoặc ít nhất ba axit amin. Chất phân cắt có thể bao gồm các cathepsin B và D và plasmin, đã biết rằng toàn bộ các chất này có thể thủy phân được các dẫn xuất dược chất đipeptit làm giải phóng dược chất có hoạt tính nằm ngoài các tế bào đích. Ví dụ, liên kết peptiđyl có thể được phân cắt được bởi proteaza cathepsin-B phụ thuộc thiol, được biểu hiện ở mức cao trong mô bệnh ung thư, có thể được sử dụng (ví dụ, liên kết Phe-Leu hoặc Gly-Phe-Leu-Gly). Theo các phương án cụ thể, liên kết peptiđyl có thể phân cắt được bởi proteaza nội bào là liên kết Val-Cit hoặc liên kết Phe-Lys. Một lợi ích khi sử dụng quá trình giải phóng phân giải protien nội bào của dược chất gây độc tế bào là chất thường bị suy yếu khi được tạo tiếp hợp và độ ổn định trong huyết thanh của thể tiếp hợp thường là cao.

Theo các phương án khác, liên kết có thể phân cắt được là nhạy với độ pH, nghĩa là nhạy với quá trình thủy phân ở các trị số pH nhất định. Thông thường, liên kết nhạy với độ pH có thể thủy phân được trong các điều kiện có tính axit. Ví dụ, liên kết không bền với axit có thể thủy phân được trong lysosom (ví dụ, hyđrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, cis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc các loại tương tự) có thể được sử dụng. Chất liên kết như vậy là tương đối ổn định trong các điều kiện độ pH trung tính, như các chất trong máu, nhưng không ổn định ở độ pH nhỏ hơn 5,5 hoặc 5,0, độ pH khoảng của lysosom. Theo các phương án nhất định, liên kết có thể thủy phân được là liên kết thioete (như, ví dụ, thioete được gắn vào tác nhân trị liệu thông qua liên kết axylhyđrazon.

Theo các phương án khác, liên kết có thể phân cắt được trong các điều kiện khử (ví dụ, liên kết đisulfua). Nhiều chất liên kết đisulfua đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, các chất có thể được tạo ra bằng cách sử dụng SATA (N-sucxinimiđyl-S-axetylthioaxetat), SPDP (N-sucxinimiđyl-3-(2-pyriđylđithio)propionat), SPDB (N-sucxinimiđyl-3-(2-pyriđylđithio)butyrat) và SMPT (N-sucxinimiđyl-oxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyriđyl-đithio)toluen)- , SPDB và SMPT.

Ví dụ không giới hạn về chất liên kết không phân cắt được được hoặc "không khử được", có thể được đề cập là thể tiếp hợp miễn dịch Trastuzumab-DM1 (TDM1) kết hợp trastuzumab với chất hoá trị liệu được liên kết, maytansine.

Theo một phương án ưu tiên, thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, i) phản ứng giữa nhóm ái nhân của kháng thể với chất phản ứng liên kết hai hóa trị, tiếp đó là phản ứng với dược chất gây độc tế bào hoặc ii) phản ứng giữa nhóm ái nhân của dược chất gây độc tế bào với chất phản ứng liên kết hai hóa trị, tiếp đó là phản ứng với nhóm ái nhân của kháng thể.

Các nhóm ái nhân trên kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm amin có đầu N, nhóm amin mạch bên, ví dụ, lysin, nhóm thiol mạch bên, và hyđroxyl của đường hoặc nhóm amino khi protein gắn kết kháng nguyên được glycosyl hóa. Các nhóm amin, thiol, và hyđroxyl là các nhóm ái nhân và có khả năng phản ứng để tạo ra liên kết cộng hoá trị với các nhóm ưa điện tử trên các gốc liên kết và các chất phản ứng liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este hoạt tính như este NHS, este HOBt, haloformat, và axit halogenua; alkyl và benzyl halogenua như các nhóm haloaxetamit; alđehyt, keton, carboxyl, và maleimit. Kháng thể này có thể có đisulfua nội chuỗi có thể khử được, tức là cầu xystein. Kháng thể có thể được hoạt hóa để tiếp hợp với các chất phản ứng liên kết bằng cách cho phản ứng với chất khử như DTT (đithiotreitol). Do đó, mỗi cầu xystein sẽ tạo ra hai nhóm ái nhân thiol có hoạt tính theo lý thuyết. Các nhóm ái nhân khác có thể được đưa vào kháng thể thông qua phản ứng bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ không giới hạn về các nhóm thiol có hoạt tính có thể được đưa vào kháng thể bằng cách đưa một hoặc nhiều gốc xystein.

Thể tiếp hợp miễn dịch cũng có thể được sản xuất bằng cách cải biến kháng thể để đưa các gốc ưa điện tử, có thể phản ứng với các phần tử thế ái nhân trên chất phản ứng liên kết hoặc dược chất gây độc tế bào. Đường của kháng thể được glycosyl hóa có thể được oxy hoá để tạo ra các nhóm alđehyt hoặc keton có thể phản ứng với nhóm amin của các chất phản ứng liên kết hoặc dược chất gây độc tế bào. Các nhóm bazơ Schiff imin thu được có thể tạo ra liên kết thích hợp, hoặc có thể được khử để tạo ra các liên kết amin thích hợp. Theo một phương án, phản ứng giữa phần hyđrat cacbon của kháng thể được glycosyl hóa với galactoza oxiđaza hoặc natri meta-periođat có thể thu được các nhóm

carbonyl (alđehyt và keton) trong kháng thể có thể phản ứng với các nhóm thích hợp trên dược chất. Theo một phương án khác, các kháng thể chứa serin có đầu N hoặc gốc threonin có thể phản ứng với natri meta-periođat, từ đó tạo ra alđehyt thay cho axit amin đầu tiên.

Theo các phương án ưu tiên nhất định, đơn vị liên kết có thể có công thức sau:

--Ta--Ww--Yy--

trong đó:

-T- là đơn vị kéo căng;

a bằng 0 hoặc 1;

-W- là đơn vị axit amin;

w độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12;

-Y- là đơn vị đệm;

y bằng 0, 1 hoặc 2.

Đơn vị kéo căng (-T-), khi có mặt, liên kết kháng thể với đơn vị axit amin (-W-). Các nhóm chức thích hợp có thể có mặt trên kháng thể, hoạt động tự nhiên hoặc bằng cách hóa học, bao gồm sulfhyđryl, amino, hyđroxyl, nhón anomeric hyđroxyl của hyđrat cacbon, và carboxyl. Các nhóm chức thích hợp là sulfhyđryl và amino. Các nhóm sulfhyđryl có thể được tạo ra bằng cách khử các liên kết đisulfua nội phân tử của kháng thể, nếu có mặt. Theo cách khác, các nhóm sulfhyđryl có thể được tạo ra bằng cách cho nhóm amino của gốc lysin của kháng thể phản ứng với các chất phản ứng tạo 2-iminothiolan hoặc khác sulfhyđryl. Theo các phương án cụ thể, kháng thể là kháng thể tái tổ hợp và được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để mang một hoặc nhiều lysin. Tốt hơn nữa, nếu kháng thể có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để mang một hoặc nhiều xystein (tham khảo tài liệu ThioMabs).

Theo các phương án cụ thể nhất định, đơn vị kéo căng tạo ra liên kết với nguyên tử lưu huỳnh của kháng thể. Nguyên tử lưu huỳnh có thể có nguồn gốc từ nhóm sulfhyđryl (--SH) của kháng thể đã được khử.

Theo các phương án cụ thể khác, đơn vị kéo căng được liên kết với kháng thể thông qua liên kết đisulfua giữa nguyên tử lưu huỳnh của kháng thể và nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị kéo căng.

Theo các phương án cụ thể khác, nhóm hoạt động của đơn vị kéo căng chứa vị trí hoạt động có thể phản ứng với nhóm amino của kháng thể. Nhóm amino có thể là nhóm arginin hoặc lysin. Các vị trí hoạt động amin thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este được hoạt hóa như este sucxinimit, este 4-nitrophenyl, este pentaflophenyl, anhyđrit, axit clorua, sulfonyl clorua, izoxyanat và izothioxyanat.

Theo một khía cạnh khác nữa, nhóm chức hoạt động của đơn vị kéo căng chứa vị trí hoạt động phản ứng với nhóm hyđrat cacbon được cải biến mà có thể có mặt trên kháng thể. Theo phương án cụ thể, kháng thể được glycosyl hóa bằng enzym để tạo ra gốc hyđrat cacbon. Hyđrat cacbon có thể được oxy hóa nhẹ bằng chất phản ứng như natri periođat và đơn vị carbonyl thu được của hyđrat cacbon được oxy hóa có thể được ngưng tụ bằng đơn vị kéo căng chứa nhóm chức như hyđrazit, oxim, amin hoạt động, hyđrazin, thiosemicarbazit, hyđrazin carboxylat, hoặc arylhyđrazit.

Đơn vị axit amin (-W-) liên kế đơn vị kéo căng (-T-) với đơn vị đệm (-Y-) nếu đơn vị đệm này có mặt, và liên kết đơn vị kéo căng này với dược chất gây độc tế bào nếu đơn vị đệm không có mặt.

Như nêu trên, -Ww- có thể là đơn vị đipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit, hexapeptit, heptapeptit, octapeptit, nonapeptit, đecapeptit, unđecapeptit hoặc đođecapeptit.

Theo một số phương án, đơn vị axit amin có thể chứa các gốc axit amin như, nhưng không chỉ giới hạn ở, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, lysin được bảo vệ bằng axetyl hoặc formyl, arginin, arginin được bảo vệ bằng nhóm tosyl hoặc nitro, histiđin, ornithin, ornithin được bảo vệ bằng axetyl hoặc formyl và xitrulin. Các thành phần liên kết axit amin được minh họa bằng ví dụ bao gồm tốt hơn nếu đipeptit, tripeptit, tetrapeptit hoặc pentapeptit.

Các đipeptit được minh họa bằng ví dụ bao gồm: Val-Cit, Ala-Val, Ala-Ala, Val-Ala, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosyl-Arg, Phe-N^9-Nitro-Arg.

Tripeptit được minh họa bằng ví dụ bao gồm: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

Tetrapeptit được minh họa bằng ví dụ bao gồm: Gly-Phe-Leu-Gly (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.53), Ala-Leu-Ala-Leu (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.54).

Pentapeptit được minh họa bằng ví dụ bao gồm: Pro-Val-Gly-Val-Val (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.55).

Các gốc axit amin bao gồm thành phần liên kết axit amin bao gồm các gốc xuất hiện trong tự nhiên, cũng như axit amin không quan trọng và chất tương tự axit amin không xuất hiện trong tự nhiên, như xitrulin. Các thành phần liên kết axit amin có thể được thiết kế và được tối ưu hóa khi chọn lọc chúng để phân giải enzym bằng enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên quan đến khối u, cathepsin B, C và D, hoặc plasmin proteaza.

Đơn vị axit amin của liên kết có thể được phân giải enzym bởi enzym bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza liên quan đến khối u để giải phóng dược chất gây độc tế bào.

Đơn vị axit amin có thể được thiết kế và được tối ưu hóa khi chọn lọc nó để phân giải enzym bằng proteaza cụ thể liên quan đến khối u. Đơn vị thích hợp là đơn vị phân giải được xúc tác bởi proteaza, cathepsin B, C và D, và plasmin.

Đơn vị đệm (-Y-), khi có mặt, liên kết đơn vị axit amin với dược chất gây độc tế bào. Các đơn vị không gian là đơn vị trong số hai loại thông thường: tự chết và không tự chết. Đơn vị đệm không tự chết là đơn vị trong đó một phần hoặc toàn bộ đơn vị đệm vẫn gắn kết với dược chất gây độc tế bào sau khi phân giải enzym của đơn vị axit amin từ thể tiếp hợp miễn dịch. Ví dụ về đơn vị đệm không tự chết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở đơn vị đệm (glyxin-glyxin) và đơn vị đệm glyxin. Để giải phóng dược chất gây độc tế bào, phản ứng thủy phân độc lập cần xảy ra trong tế bào đích để phân giải liên kết đơn vị glyxin-dược chất.

Theo một phương án khác, đơn vị đệm không tự chết (-Y-) là -Gly-.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch không có đơn vị đệm (y=0). Theo cách khác, thể tiếp hợp miễn dịch chứa đơn vị đệm tự chết có thể giải phóng dược chất gây độc tế bào mà không cần bước thủy phân riêng rẽ. Theo các phương án này, -Y-

là đơn vị rượu p-aminobenzylic (PAB) được liên kết với -Ww- thông qua nguyên tử nitơ của nhóm PAB, và nối trực tiếp với -D thông qua nhóm cacbonat, carbamat hoặc ete.

Ví dụ khác về đơn vị đệm tự chết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất thơm là tương đương điện tử với nhóm PAB như các dẫn xuất 2-aminoimiđazol-5-metanol và ortho hoặc para-aminobenzylaxetal. Các đơn vị đệm có thể được sử dụng mà có thể dễ tạo vòng trong quá trình thủy phân liên kết amit, như các amit của axit 4-aminobutyric được thế và không được thế, hệ vòng bixyclo[2.2.1] và bixyclo[2.2.2] được thế thích hợp và các amit của axit 2-aminophenylpropionic.

Theo phương án khác, đơn vị đệm là đơn vị bis(hyđroxymetyl)styren (BHMS) mạch nhánh, mà có thể được sử dụng để đưa các dược chất gây độc tế bào vào.

Khả năng mang dược chất còn được gọi là tỷ lệ dược chất-kháng thể (DAR) là số trung bình của dược chất PBD trên một chất liên kết tế bào.

Trong trường hợp của isotyp IgG1 của kháng thể, trong đó dược chất được gắn kết với xystein sau khi khử một phần kháng thể, khả năng mang dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 8 dược chất (D) trên một kháng thể, tức là trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, và 8 gốc dược chất được liên kết cộng hóa trị với kháng thể.

Trong trường hợp về isotyp IgG2 của kháng thể, trong đó dược chất được gắn kết với xystein sau khi khử một phần kháng thể, khả năng mang dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 12 dược chất (D) trên một kháng thể, tức là trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 và 12 gốc dược chất được liên kết cộng hóa trị với kháng thể.

Chế phẩm chứa ADC bao gồm tập hợp các chất gắn kết tế bào, ví dụ, các kháng thể, được tiếp hợp với nhiều dược chất, nằm trong khoảng từ 1 đến 8 hoặc từ 1 đến 12.

Trong đó dược chất được gắn kết với lysin, thì khả năng mang dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 80 dược chất (D) trên một tế bào kháng thể, mặc dù giới hạn trên là 40, 20, 10 hoặc 8 có thể được ưu tiên. Chế phẩm chứa ADC bao gồm tập hợp các chất gắn kết tế bào, ví dụ, các kháng thể, được tiếp hợp với nhiều dược chất, nằm trong khoảng từ 1 đến 80, nằm trong khoảng từ 1 đến 40, nằm trong khoảng từ 1 đến 20, nằm trong khoảng từ 1 đến 10 hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

Số dược chất trung bình trên một kháng thể trong chế phẩm chứa ADC từ các phản ứng tiếp hợp có thể được đặc trưng bởi các cách thức thông thường. Kỹ thuật phân

bố định lượng ADC về mặt tỷ lệ dược chất cũng có thể được xác định. Đối với một số thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, tỷ lệ dược chất có thể bị giới hạn bởi số lượng vị trí gắn kết trên kháng thể. Ví dụ, kháng thể có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm xystein thiol, hoặc có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm thiol có đủ hoạt tính qua đó liên kết có thể được gắn vào. Khả năng mang dược chất cao hơn, ví dụ, tỷ lệ dược chất >5, có thể gây kết tụ, không hòa tan, độc tính, hoặc mất khả năng thấm tế bào của các thể tiếp hợp kháng thể-dược chất nhất định.

Các kháng thể nhất định có đisulfua nội chuỗi có thể khử được, tức là cầu xystein. Các kháng thể này có thể được tạo ra hoạt tính để tiếp hợp với các chất phản ứng liên kết bằng cách cho phản ứng với chất khử như DTT (đithiotreitol). Do đó, mỗi cầu xystein sẽ được tạo ra hai nhóm ái nhân thiol có hoạt tính theo lý thuyết. Các nhóm ái nhân khác có thể được đưa vào các kháng thể thông qua phản ứng giữa lysin với 2-iminothiolan (chất phản ứng Traut), từ đó làm chuyển hoá amin thành thiol. Các nhóm thiol có hoạt tính có thể được đưa vào kháng thể (hoặc mảnh của nó) bằng cách tạo ra một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều gốc xystein (ví dụ, điều chế kháng thể đột biến chứa một hoặc nhiều gốc axit amin xystein không có trong tự nhiên). US 7521541 đề cập đến các kháng thể tạo ra bằng cách đưa axit amin xystein hoạt tính vào.

Axit amin xystein có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ở các vị trí hoạt động trong kháng thể và không tạo ra các liên kết đisulfua nội chuỗi hoặc nội phân tử (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Các xystein thiol được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể phản ứng với các chất phản ứng liên kết hoặc chất phản ứng dược chất-liên kết theo sáng chế có thể có các nhóm có hoạt tính thiol, ưa điện tử như các amit maleimit hoặc alpha-halo để tạo ra ADC với các kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền với xystein và gốc dược chất PBD. Từ đó, vị trí của gốc dược chất có thể được thiết kế, kiểm soát, và đã biết. Khả năng mang dược chất có thể được kiểm soát do các nhóm xystein thiol được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền thường phản ứng với các chất phản ứng liên kết có hoạt tính thiol hoặc chất phản ứng dược chất-liên kết với hiệu suất cao. Việc tạo ra kháng thể IgG để đưa axit amin xystein vào bằng cách thế ở một vị trí trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ tạo ra hai xystein mới trên kháng thể đối xứng. Khả năng mang dược chất gần bằng 2 có thể thu được với tính đồng nhất gần của sản phẩm tiếp hợp ADC.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất như nêu trên để dùng làm thuốc.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất như nêu trên dùng để điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất như nêu trên để dùng làm thuốc. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất như nêu trên dùng để điều trị bệnh ung thư. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất như nêu trên dùng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện IGF-1R, hoặc bệnh ung thư liên quan đến IGF-1R.

Bệnh ung thư liên quan đến IGF-1R bao gồm các tế bào của khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức toàn bộ hoặc một phần IGF-1R ở bề mặt của chúng.

Cụ thể hơn, các bệnh ung thư này là bệnh ung thư ngực, đại tràng, bệnh ung thư biểu mô thực quản, tế bào gan, dạ dày, u thần kinh đệm, phổi, u melanin, u xương, buồng trứng, tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tổ chức liên kết cơ vân, thận, tuyến giáp, bệnh ung thư nội mạc tử cung và hiện tượng bất thường kháng lại dược chất bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế đẻ điều trị bệnh ung thư biểu hiện IGF-1R.

Đối tượng khác của sáng chế là dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch, như được mô tả trong bản mô tả.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch được nêu trên và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất được nêu trên, và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tá dược dược dụng" hoặc "tá dược" dùng để chỉ hợp chất hoặc tổ hợp các hợp chất được đưa vào dược phẩm mà không gây phản ứng thứ phát khó chịu và cho phép, ví dụ, dùng dễ dàng hoạt chất, làm tăng vòng đời của nó

và/hoặc hiệu quả của nó trong cơ thể, làm tăng độ hòa tan của nó trong dung dịch hoặc còn cải thiện quá trình chuyển hóa của nó. Các tá dược hoặc tá dược lỏng dược dụng này là đã biết và thích hợp bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này mà nó phụ thuộc vào bản chất và đường dùng của hoạt chất đã chọn.

Tốt hơn nếu các thể tiếp hợp miễn dịch này được sử dụng theo đường toàn thân, cụ thể là theo đường tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng hoặc đường dưới da, hoặc theo đường miệng. Theo cách được ưu tiên hơn, chế phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch được sử dụng một vài lần, theo cách liên tục.

Đường dùng, liều lượng và dạng dược phẩm tối ưu của chúng có thể được xác định theo tiêu chuẩn thường được thiết lập để điều trị phù hợp với bệnh nhân như, ví dụ, độ tuổi hoặc thể trọng của bệnh nhân, mức độ trầm trọng của tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân, khả năng dung nạp với việc điều trị và tác dụng thứ phát cần lưu ý.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch được nêu trên và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược lỏng dược dụng dùng để điều trị bệnh ung thư. Theo khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch được nêu trên và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược lỏng dược dụng dùng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện IGF-1R.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, và cụ thể là điều trị bệnh ung thư biểu hiện IGF-1R, bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, và cụ thể là điều trị bệnh ung thư biểu hiện IGF-1R, bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân phối dược chất hoặc thuốc tới tế bào bệnh ung thư biểu hiện IGF-1R ở đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Toàn bộ các thể lai được nêu trong sáng chế được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật (Viện Pasteur, Pháp) và được xác định trong bảng 7 sau.

Bảng 7

Tên thể lai	Số CNCM	Ngày nộp
101H8	I-4733	24/04/2013
201F1	I-4769	26/06/2013
208F2	I-4757	30/05/2013
212A11	I-4773	26/06/2013
214F8	I-4775	26/06/2013
219D6	I-4736	24/04/2013
213B10	I-4774	26/06/2013
102H8	I-4767	26/06/2013
110G9	I-4768	26/06/2013
415A8	I-4778	26/06/2013
410G4	I-4777	26/06/2013
414E1	I-4738	24/04/2013
433H9	I-4780	26/06/2013
105G2	I-4735	24/04/2013
832E5	I-4765	30/05/2013

Ví dụ 1: Sản xuất các kháng thể IGF-1R

Để sản xuất các kháng thể đơn dòng của chuột (Mabs) kháng lại miền ngoại bào của người (ECD) của thụ thể IGF-1 của người (hIGF-1R), 5 chuột nhắt BALB/c được tạo miễn dịch 3 lần dưới da bằng 10µg protein rhIGF-1R (Hệ thống R&D, Số danh mục 391-GR). Ngoài ra, ba lần gây miễn dịch bổ sung bằng 10µg miền ngoại bào của chuột (ECD) của IGF-1R (Hệ thống R&D, Số danh mục 6630-GR /Fc) được thực hiện trên một số động vật. Lần gây miễn dịch thứ nhất được thực hiện khi có mặt chất bổ trợ hoàn toàn Freund (Sigma, St Louis, MD, USA). Chất bổ trợ không hoàn toàn Freund (Sigma) được bổ sung trong các lần tạo miễn dịch tiếp theo. Ba ngày trước khi dung hợp, chuột nhắt đã tạo miễn dịch được cho dùng liều lớn 10µg protein rhIGF-1R. Sau đó, các tế bào lách và tế bào lymphô được chuẩn bị tương ứng bằng cách truyền dịch vào lá lách và bằng cách băm các u bạch huyết lân cận, được thu hoạch từ 1 trong số 5 chuột nhắt đã tạo miễn dịch (được chọn sau khi chuẩn độ huyết thanh của toàn bộ các con chuột nhắt) và được dung hợp thành các tế bào u tuỷ SP2/0-Ag14 (ATCC, Rockville, MD, USA). Quy trình dung hợp được mô tả bởi Kohler và Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Sau đó, các tế bào đã được dung hợp được sử dụng để chọn lọc HAT. Nói chung, để tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh chức năng của chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ chuột, có thể dùng các kỹ thuật được mô tả cụ thể trong sổ tay "Các kháng thể" (Harlow and Lane,

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988). Khoảng 10 ngày sau khi dung hợp, các khuẩn lạc chứa các tế bào lai được sàng lọc. Để sàng lọc sơ bộ, dịch nổi trên bề mặt chứa thể lai được đánh giá về việc tiết Mab xuất hiện kháng lại protein rhIGF-1R ECD bằng phân tích FACS có sử dụng các tế bào của khối u MCF7 ngực của người (ATCC) và/hoặc các tế bào COS7 của khỉ (SV40 của thận khỉ xanh châu Phi đã biến nạp) biểu hiện IGF-1R của khỉ trên bề mặt tế bào của chúng. Chính xác hơn nữa, để chọn lọc bằng cách đo dòng tế bào, 10^5 tế bào (MCF7 hoặc COS7) được đặt vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng trong PBS chứa 1% BSA và 0,01% natri azit (chất đệm FACS) ở nhiệt độ 4°C. Sau 2 phút ly tâm ở 2000 vòng/phút, chất đệm được loại bỏ và dịch nổi trên bề mặt chứa thể lai cần thử nghiệm được bổ sung vào. Sau 20 phút ủ ở nhiệt độ 4°C, các tế bào được rửa hai lần và kháng thể của dễ kháng IgG của chuột nhắt được tạo tiếp hợp với Alexa 488 1/500° được pha loãng trong chất đệm FACS (#A11017, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) được bổ sung và được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa lần cuối bằng chất đệm FACS, các tế bào này được phân tích bằng FACS (Facscalibur, Becton-Dickinson) sau khi bổ sung propiđi iođua vào mỗi ống ở nồng độ cuối bằng 40µg/mL. Các giếng chứa các tế bào riêng rẽ và các tế bào được ủ với kháng thể được tạo tiếp hợp với Alexa 488 thứ cấp được sử dụng làm chất đối chứng âm. Các isotyp đối chứng được sử dụng trong mỗi thử nghiệm (Sigma, ref M90351MG). Ít nhất 5000 tế bào được đánh giá để tính toán trị số trung bình của cường độ phát huỳnh quang (MFI).

Ngoài ra, thử nghiệm nội bào hóa được thực hiện chỉ để chọn lọc các kháng thể nội bào hóa. Đối với thử nghiệm này, dòng tế bào khối u MCF7 được nuôi cấy trong RMPI 1640 mà không có phenol đỏ với 1% L-glutamin và 10% FACS trong 3 ngày trước khi thử nghiệm. Sau đó, các tế bào được tách ra bằng cách sử dụng trypsin và 100µL hỗn dịch tế bào ở 4.10^5 tế bào/mL được đặt trong đĩa 96 giếng với tốc độ 1640 vòng/phút không có phenol đỏ với 1% L-glutamin và 5% FBS. Sau 2 phút ly tâm ở 2000 vòng/phút, các tế bào được tạo hỗn dịch lại trong 50µL dịch nổi trên bề mặt chứa thể lai hoặc dung dịch kháng thể đối chứng (isotyp dương tính và đối chứng ở 1µg/mL). Sau 20 phút ủ ở nhiệt độ 4°C, các tế bào này được ly tâm 2 phút ở 2000 vòng/phút và tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy hoàn toàn lạnh (4°C) hoặc ấm (37°C). Sau đó, các tế bào này được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C hoặc ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các tế bào này được rửa ba lần bằng chất đệm FACS. Kháng thể IgG kháng chuột nhắt của dê được đánh dấu

bằng Alexa 488 được ủ trong 20 phút và các tế bào này được rửa ba lần trước khi phân tích FACS trên quần thể tế bào âm tính propiđi iođua.

Sau khi phân tích FACS, hai tham số được xác định: (i) sự khác nhau về tín hiệu phát huỳnh quang phát hiện được trên bề mặt tế bào được ủ ở nhiệt độ 4°C với các tín hiệu thu được bằng các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C với một dịch nổi trên bề mặt chứa thể lai và (ii) tỷ lệ phần trăm của IGF-1R còn lại trên bề mặt tế bào.

Tỷ lệ phần trăm của hIGF-1R còn lại được tính toán như sau:

$$\textbf{\% IGF-1R còn lại} = (\textbf{MFI}_{\text{Ab } 37°C} / \textbf{MFI}_{\text{Ab } 4°C}) \times 100$$

Ngoài ra ba thử nghiệm ELISA được thực hiện (trước hoặc sau khi tách dòng) để nghiên cứu khả năng gắn kết của các kháng thể trên các protein tái tổ hợp của người (hIGF-1R) và chuột (mIGF-1R), và trên protein thụ thể insulin tái tổ hợp của người (hIR). Thể lai tiết ra kháng thể có khả năng gắn kết trên rh- và/hoặc rm-IGF-1R và không gắn kết trên rhIR được giữ lại. Tóm lại, các đĩa 96 giếng của thử nghiệm ELISA (Costar 3690, Corning, NY, USA) được phủ bằng 100µL/giếng chứa protein rhIGF-1R (Hệ thống R&D, số danh mục 391-GR) ở 0,6µg/mL hoặc protein rmIGF-1R (Hệ thống R&D, số danh mục 6630-GR/Fc) ở1µg/mL hoặc protein rhIR (Hệ thống R&D, số danh mục 1544-IR/CF) ở 1µg/mL trong PBS qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các đĩa được phong bế bằng PBS chứa 0,5% gelatin (#22151, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Đức) trong 2 h ở nhiệt độ 37°C. Ngay khi dung dịch đệm bão hòa được loại bỏ bằng các đĩa tách, 100µL mỗi dịch nổi trên bề mặt pha loãng được bổ sung vào các giếng (dịch nổi trên bề mặt không được pha loãng chứa thể lai và dịch nổi trên bề mặt pha loãng theo dãy) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau ba lần rửa, 100µL kháng thể đa dòng của dê kháng IgG của chuột nhắt được tiếp hợp với peroxiđaza của củ cải đường (#115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) được bổ sung với tỷ lệ pha loãng 1/5000 trong PBS chứa 0,1% gelatin và 0,05% Tween 20 (w:w) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, các đĩa ELISA được rửa 3 lần và cơ chất TMB (#UP664782, Uptima, Interchim, Pháp) được bổ sung. Sau khi ủ 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, phản ứng được dừng lại bằng cách sử dụng axit sulfuric 1M và mật độ phát quang ở 450 nm được đo.

Thể lai tiết ra kháng thể quan tâm được kéo dài và tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Ngay khi được tạo isotyp, một dòng của mỗi mã được kéo dài và được làm đông lạnh. Mỗi kháng thể quan tâm được tạo ra trong hệ thống sản xuất *in vitro* có tên gọi CellLine (Integra Biosciences) để mô tả tiếp các đặc điểm.

Các thử nghiệm bổ sung để định hướng tính đặc hiệu gắn kết bằng cách phân tích FACS được thực hiện trên các tế bào IM9 (nguyên bào lymphô B biểu hiện IR của người) cũng như trên các tế bào hIGF-1R đã được chuyển nhiễm so với các tế bào không được chuyển nhiễm.

Toàn bộ dữ liệu tương ứng với các kháng thể đã chọn được tóm tắt trong bảng 8. Cần nhất là trong số các kháng thể được chọn i) trên cơ sở tính chọn lọc của chúng đối với hIGF-1R so với hIR và ii) dựa trên khả năng tạo ra quá trình nội bào hóa IGF-1R của chúng, một số kháng thể có khả năng nhận diện đích của chúng trong cả các thiết lập ELISA và FACS đồng thời các kháng thể khác là các chất gắn kết rất tốt được nghiên cứu bởi máy đo dòng tế bào và là chất gắn kết rất kém khi được đánh giá bằng ELISA. m280F2, m212A11, m213B10, m214F8 và m219D6 thuộc nhóm sau này mà không nhận diện được protein đã được phủ.

Bảng 8

	Thể lai	ELISA (SNT ở 5μg/mL) D.O 450nm			Thử nghiệm nội bào hóa (Ab ở 5μg/mL)				FACS (Ab ở 5μg/mL)			
					MFI				MFI			
		rh IGF-1R	rm IGF-1R	rh Insulin R	4°C	37°C	% rh IGF1R còn lại	Δ (MFI 4°C-MFI 37°C)	IM9 (h IR$^+$)	Cos-7 (IGF1R$^+$ của khỉ)	Tf hIGF1R+	Tế bào không phải Tf (h IGF1R$^-$)
1	101H8	1,552	0,115	0,125	373	128	34	246	9	145	1902	10
2	102H8	1,988	0,136	0,130	360	140	39	220	10	136	2026	10
3	105G2	2,409	0,166	0,205	301	114	38	187	9	114	1673	11
4	110G9	1,989	0,133	0,153	396	126	32	270	10	146	2208	7
5	201F1	1,756	0,165	0,156	357	81	23	276	8	119	1987	15
6	208F2	0,163	0,099	0,140	355	94	27	261	4	106	2197	22
7	212A11	0.232	0,102	0,141	390	106	27	284	7	125	2187	23
8	213B10	0,399	0,127	0,110	386	115	30	271	7	122	2055	23
9	214F8	0,349	0,102	0,115	386	111	29	275	7	132	2137	20
10	219D6	0,329	0,112	0,103	349	106	30	243	7	114	2110	21
11	410G4	2,937	0,135	0,095	619	229	37	390	11	158	2260	34
12	414E1	3,009	0,099	0,093	729	188	26	540	13	204	2740	36
13	415A8	3,044	0,107	0,089	727	174	24	553	12	188	2960	32
14	433H9	3,104	0,154	0,131	617	153	25	464	13	206	2590	24
15	832E5	1,854	0,107	0,048	134	82	61	52	5	24*	Không xác định	Không xác định

16	mIgG1	0,093	0,116	0,127	9	8	94	1	5	14	24	22
* FACS được nhận diện bằng cách sử dụng kháng thể tinh khiết												

Ví dụ 2: Mô tả đặc điểm của việc xếp nhóm epitop kháng thể kháng IGF-1R bằng thử nghiệm lập bản đồ có sử dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt Biacore

Để nghiên cứu tính đa dạng của đáp ứng với IGF-1R, các kháng thể đã chọn được lập bản đồ bởi Biacore và việc xếp nhóm các kháng thể này theo các đặc tính cạnh tranh được thực hiện.

Tóm lại, các thử nghiệm lập bản đồ epitop được thực hiện trên thiết bị Biacore X bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 được hoạt hóa bởi kháng thể kháng Tag His (Bộ kit bắt giữ His có số danh mục GE Healthcare 28-9950-56). Hơn 11000 RU kháng thể được ghép hóa học trên nền carboxymetylđextan bằng cách sử dụng bộ kit amin hóa học. Các thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng bằng 1μL/phút bằng cách sử dụng dung dịch đệm HBS-EP (GE Healthcare) làm dung dịch đệm pha loãng hoạt động và dung dịch đệm pha loãng mẫu.

Thử nghiệm lập bản đồ epitop được thực hiện theo cùng một sơ đồ:

1-Dung dịch chứa phiên bản hòa tan của hIGF-1R tetrame khác loại (chuỗi 2α và miền ngoại bào chứa các chuỗi 2β đã được biểu hiện bằng dấu 10-His có đầu tận cùng C bổ sung (Hệ thống R&D có số danh mục 305-GR)) được tiêm vào với nồng độ 5μg/mL trên cả hai dòng tế bào trong 1 phút.

2-Dung dịch chứa kháng thể kháng hIGF-1R (theo cách thông thường 50μg/mL) cần thử nghiệm sau đó chỉ được tiêm trên dòng tế bào 1 trong thời gian khoảng từ 60 đến 90 giây để đạt tới (hoặc ít nhất gần đạt tới) mức độ bão hòa của các vị trí gắn kết hIGF-1R.

3-Dung dịch chứa kháng thể thứ hai, được sử dụng làm dung dịch cạnh tranh tiềm năng, được tiêm vào trong cùng một điều kiện ở cả hai dòng tế bào hoặc chỉ trên dòng tế bào thứ hai.

4-Cuối cùng, dung dịch chứa kháng thể thứ ba có thể được tiêm vào trong cùng một điều kiện trên cả hai dòng tế bào.

5-Sau đó, bề mặt được tái tạo bằng cách tiêm glyxin 10mM, dung dịch đệm HCl có độ pH = 1,5 trong 30 giây.

Loại thử nghiệm này được thể hiện một cách rõ ràng nếu hai kháng thể có thể gắn kết đồng thời trên cùng một phân tử chứa hIGF-1R thì chứng tỏ rằng các vùng liên kết (epitop) của mỗi kháng thể là đủ xa để thực hiện việc này. Trái lại, nếu quá trình gắn kết kháng thể với hIGF-1R ngăn cản được quá trình gắn kết kháng thể thứ hai thì gợi ý rằng cùng một epitop được nhận diện bởi cả hai kháng thể. Cuối cùng, trong trường hợp cạnh tranh một phần, có thể xảy ra quá trình chồng lấp các epitop đã được nhận diện bởi hai kháng thể đã được thử nghiệm. Do đó, các nhóm vùng epitop được xác định. Mức độ phức tạp của kết quả thường làm tăng kích cỡ của bảng gồm các kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm.

Fig.1 mô tả ví dụ về chu trình tiêu biểu của thử nghiệm lập bản đồ epitop bằng cách sử dụng thiết bị Biacore X trên cơ sở SPR. Đồ thị cảm biến thể hiện đáp ứng (RU) làm hàm số theo giời giản (giây) của các dòng tế bào 1 (hình thoi màu đen) và 2 (hình thoi màu trắng). Ở pha 1, dung dịch chứa kháng nguyên: hIGF-1R tái tổ hợp hòa tan với hai trình tự đánh dấu 10-His có đầu tận cùng C được tiêm trên cả hai dòng tế bào chứa chip cảm biến CM5 với kháng thể kháng trình tự đánh dấu His của chuột nhắt được liên kết hóa học với nền carboxymetylđextran ở nồng độ 5μg/mL với tốc độ dòng bằng 10μL/phút.

Ở pha 2, dung dịch chứa kháng thể thứ nhất cần thử nghiệm (219D6) ở nồng độ 50μg/mL được tiêm trên dòng tế bào 1. Sau đó ở pha 3, dung dịch chứa kháng thể thứ hai (101H8) ở nồng độ 50μg/mL được tiêm trên dòng tế bào 2, sau đó ở pha 4, bằng cách tiêm dung dịch chứa kháng thể thứ ba (201F1) ở nồng độ 50μg/mL trên cả hai dòng tế bào. Đáp ứng của việc tiêm này rõ ràng chứng tỏ rằng quá trình gắn kết của 201F1 trên IGF-1R không những được ngăn cản bởi 101H8 mà còn bởi 219D6. Các kháng thể 201F1 và 219D6 rõ ràng thuộc nhóm epitop khác nhau. Việc xếp nhóm dẫn tới việc phân tích toàn bộ 15 chất chọn lọc đã chọn được mô tả trong Fig.2 và đã chứng minh được rằng việc tạo miễn dịch của chuột nhắt bằng hIGF-1R sẽ làm cho một loạt các kháng thể có tính khác biệt tốt. Thực vậy, 5 nhóm Mab khác nhau nhận diện các epitop khác nhau được tạo ra.

Ví dụ 3: Kháng thể gắn kết với IGF-1R tự nhiên của người bằng cách phân tích FACS

Các đặc tính gắn kết của một loạt các kháng thể kháng IGF-1R được đánh giá bằng các phân tích FACS trên dòng tế bào bệnh ung thư tuyến vú MCF-7 của người (ATCC#HTB-22) bằng cách sử dụng nồng độ kháng thể tăng dần. Nhằm mục đích này, các tế bào ($1x10^6$ tế bào/mL) được ủ với kháng thể kháng IGF-1R trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C trong chất đệm FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, chúng được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp đã được liên hợp với Alexa 488 trng 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trước khi rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay trên các tế bào sống sót được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua (nhuộm các tế bào đã chết). Cường độ tín hiệu tối đa thu được bởi mỗi kháng thể được thiết kế ở dạng B_{max} và được biểu thị là cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI). EC_{50} của quá trình gắn kết được biểu thị ở dạng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

Đường cong chuẩn độ của mỗi Ab của chuột hoặc thể khảm đã chứng minh được rằng toàn bộ các kháng thể tạo ra có khả năng nhận diện dạng IGF-1R tự nhiên với đặc tính bão hòa thông thường (Fig.3A). Để sắp xếp các kháng thể và để so sánh các đặc tính gắn kết của cả Ab của chuột lẫn Ab thể khảm, trị số gắn kết EC_{50} của mỗi hợp chất được xác định bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính. Việc so sánh EC_{50} của mỗi Ab của chuột với dạng thể khảm tương ứng của nó chỉ ra rằng 2 dạng này có cùng đặc tính gắn kết, từ đó chứng tỏ rằng quá trình thể khảm hóa Ab không ảnh hưởng tới việc nhận diện IGF-1R (Fig.3B). EC_{50} nằm trong khoảng từ $1,2x10^{-8}$ đến $4,4x10^{-10}$. Các kháng thể thuộc nhóm 2 và c102H8 thuộc nhóm 3a có EC_{50} cao hơn. Liên quan đến các phân tích B_{max} (Fig.3C), ba Ab (414E1 (G3b), 105G2 (G4) và 832E5 (G5) có B_{max} thấp hơn so với Ab khác. Các trị số EC_{50} và B_{max} được tóm tắt trong bảng 9.

Bảng 9

Nhóm	Ac	B_{max}	EC_{50}(M)
G1	c101H8	905	2,8E-09
G3a	c102H8	951	8,5E-10
G4	c105G2	805	4,9E-09
G3a	c110G9	992	1,4E-09
G1	c201F1	936	1,5E-08
G2	c208F2	981	6,7E-10
G2	c212A11	991	6,7E-10
G2	c214F8	1069	5,0E-10
G2	c219D6	993	4,7E-10

G2	c213B10	1103	4,4E-10
G3b	c410G4	1020	2,6E-09
G3b	c414E1	795	6,0E-09
G3a	c415A8	1142	1,6E-09
G3b	c433H9	1032	1,7E-09
G5	c832E5	691	1,2E-08

Ví dụ 4: Xác nhận về tính đặc hiệu kháng thể bằng cách sử dụng tế bào đã chuyển nhiễm IGF-1R hoặc IR hoặc tế bào IM9 biểu hiện tự nhiên IR ở nồng độ đáng kể

Để xác nhận về tính đặc hiệu của các kháng thể đã được tạo ra đối với hIGF-1R so với hIR, các chất chuyển nhiễm thích hợp biểu hiện hIGF-1R hoặc hIR được đánh giá bằng các phân tích FACS. Tóm lại, mAbs thể khảm với nồng độ tăng dần được ủ với các tế bào này trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C trong chất đệm FACS (PBS, 0,1%BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, các tế bào được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp đã được liên hợp với Alexa 488 trước khi ủ trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện trên các tế bào sống sót được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua (nhuộm các tế bào đã chết). Trị số gắn kết EC_{50} được biểu thị bằng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

Đường cong chuẩn độ thu được trên dòng tế bào đã chuyển nhiễm hIGF-1R (Fig.4A) so với các tế bào không được chuyển nhiễm (Fig.4B) xác nhận tính đặc hiệu gắn kết của Ab thể khảm đối với IGF-1R của người. Các trị số EC_{50} và B_{max} được tóm tắt trong bảng 10. Trong thử nghiệm này, các kháng thể từ nhóm G2 và G3a thu được trị số EC_{50s} tốt nhất.

Bảng 10

Group	Ac	B_{max}	EC_{50} (M)
G1	c101H8	2107	1.2E-09
G1	c201F1	2500	1.1E-08
G2	c208F2	2008	3.2E-10
G2	c212A11	2513	4.4E-10
G2	c214F8	2094	2.7E-10
G2	c219D6	2521	5.5E-10
G2	c213B10	2029	3.3E-10
G3a	c102H8	2594	5.4E-10
G3a	c110G9	2189	5.2E-10
G3a	c415A8	2728	7.0E-10
G3b	c410G4	1667	7.1E-10
G3b	c414E1	2265	1.9E-09
G3b	c433H9	2165	6.5E-10
G4	c105G2	2396	1.7E-09
G5	c832E5	1998	7.3E-09

Để kiểm tra sự không có mặt của quá trình gắn kết của kháng thể của chuột và kháng thể thể khảm trên hIR, dòng tế bào ổn định biểu hiện IR của người được sử dụng. Khả năng nhận diện bề mặt tế bào hIR của người bởi Ab của chuột và Ab thể khảm được thực hiện bằng cách phân tích FACS. Nồng độ tăng dần của mAb của chuột hoặc mAb thể khảm được ủ trên dòng tế bào đã chuyển nhiễm hIR^+ trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C trong chất đệm FACS (PBS, 0,1%BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, các tế bào này được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp đã được liên hợp với Alexa 488 trước khi ủ trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay trên các tế bào sống sót mà đã được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua (nhuộm các tế bào đã chết). Trị số gắn kết EC_{50} biểu thị bằng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0). Kháng thể kháng IGF-1R đặc hiệu thương mại, dòng GR11L và dòng GRO5 kháng thể kháng hIR được sử dụng làm các kháng thể đối chứng dương. c9G4 được sử dụng làm kháng thể không liên quan (kháng thể đối chứng isotyp).

Mức biểu hiện hIR cao trên bề mặt tế bào của các tế bào đã được chuyển nhiễm được xác nhận bằng cách sử dụng kháng thể kháng hIR thương mại GRO5. Ngay cả khi sử dụng các nồng độ cao Ab kháng hIGF-1R của chuột (Fig.5A) hoặc thể khảm (Fig.5B),

cũng không quan sát được quá trình gắn kết trên bề mặt tế bào hIR^+ đã được chuyển nhiễm. Các kết quả này đã chứng minh được rằng Ab kháng hIGF-1R không phải của chuột hoặc thể khảm không nhận diện được hIR.

Tính đặc hiệu của quá trình nhận diện hIGF-1R này so với IR còn được chứng minh bằng cách sử dụng các tế bào IM9, dòng tế bào u bạch huyết B biểu hiện hIR (Fig.6). Đối với phân tích FACS này, quy trình được thực hiện tương tự do quy trình này đã được nêu trên và kháng thể kháng IGF-1R của chuột được sử dụng để ngăn ngừa khả năng phản ứng ngang của Ab kháng người thứ cấp (các tế bào IM9 biểu hiện người Ig trên bề mặt tế bào của chúng). Các kết quả thể hiện trên Fig.6 một lần nữa chứng minh được rằng tín hiệu mong muốn được quan sát bằng cách sử dụng kháng thể kháng hIR GRO5 trong khi đó không có kháng thể nào của chuột được đánh giá biểu hiện được tín hiệu gắn kết đáng kể bất kỳ trên dòng tế bào này.

Ví dụ 5: Kháng thể gắn kết với IGF-1R tự nhiên của khỉ bằng cách phân tích FACS và Biacore

Một trong những điều kiện tiên quyết đầu tiên để nghiên cứu độc tính điều biến là cần xác định loài động vật thích hợp để đánh giá hợp chất đã được chọn. Do dãy các kháng thể được nêu trong bản mô tả này không thể nhận diện IGF-1R của chuột, nên loài thích hợp nhất để đánh giá độc tính là loài linh trưởng không phải người (NHP).

Để đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể kháng IGF-1R trên IGF-1R của khỉ, quá trình gắn kết của kháng thể kháng hIGF-1R của chuột và kháng thể thể khảm kháng hIGF-1R được đánh giá bằng các phân tích FACS trên dòng tế bào COS-7 bằng cách sử dụng nồng độ kháng thể tăng dần. Các tế bào ($1x10^6$ tế bào/mL) được ủ với kháng thể kháng IGF-1R trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C trong chất đệm FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, các tế bào này được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp đã được liên hợp với Alexa 488 trước khi ủ trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối và cuối cùng rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết của kháng thể kháng IGF-1R được đánh giá ngay trên các tế bào sống sót đã được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua (nhuộm các tế bào đã chết). Trị số gắn kết EC_{50} biểu thị bằng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

Đường cong chuẩn độ thu được trên dòng tế bào COS-7 của khỉ chỉ ra rằng đối ngoại trừ 832E5 mAb, toàn bộ Ab kháng hIGF-1R nhận diện đặc hiệu IGF-1R biểu hiện trên bề mặt của dòng tế bào của khỉ (Fig.7A). Việc xác định EC_{50} đối với mỗi Ab của chuột chuột và Ab thể khảm chỉ ra rằng 2 dạng được so sánh đều tốt về các đặc tính gắn kết của chúng trên IGF-1R của khỉ (Fig.7B). Các kết quả này chỉ ra rằng toàn bộ kháng thể kháng hIGF-1R đã được tạo ra ngoại trừ mAb 832E5 đều nhận diện được IGR-1R của khỉ.

Việc so sánh khả năng gắn kết EC_{50} trên các tế bào COS-7 so với các tế bào IGF-1R đã được chuyển nhiễm được thực hiện để kiểm tra mức độ nhận diện kháng thể thể khảm trên người so với IGF-1R của khỉ. Các kết quả được thể hiện trên Fig.7B đã chứng minh được rằng việc nhận diện IGF-1R của người và IGF-1R của khỉ là tương tự nhau bởi toàn bộ các kháng thể ngoại trừ 832E5 mAb.

Để xác nhận khả năng nhận diện trên loại khác của khỉ, các tế bào được chuyển nhiễm với dạng IGF-1R của khỉ Cynomolgus để tạo ra IGF-1R ECD hòa tan của khỉ và thử nghiệm Biacore được thực hiện bởi một trong số các kháng thể thể khảm (c208F2) để so sánh các đặc tính gắn kết của hIGF-1R hoặc IGF-1R của khỉ cynomolgus.

Các thử nghiệm nhận diện được thực hiện trên thiết bị Biacore X100 bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 được hoạt hóa bởi kháng thể kháng Tag His (Bộ kit bắt giữ His của GE Healthcare với số danh mục 28-9950-56). Hơn 11000 RU của kháng thể được ghép hóa học trên nền carboxymetylđextan bằng cách sử dụng bộ kit amin hóa học. Các thử nghiệm này được thực hiện ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng bằng 30μL/phút bằng cách sử dụng dung dịch đệm HBS-EP (GE Healthcare) làm dung dịch đệm hoạt động và dung dịch đệm pha loãng mẫu. Sơ đồ động học về một chu trình được sử dụng để xác định tham số động học về việc gắn kết của dạng thể khảm của kháng thể kháng IGF-1R 208F2 (c208F2) trên hIGF-1R được so sánh với Macaca IGF-1R

Dung dịch chứa phiên bản tái tổ hợp hòa tan của IGF-1R tetrame khác loại bao gồm các chuỗi 2β và miền ngoại bào của chuỗi 2α đã được biểu hiện bằng dấu 10-His có đầu tận cùng C bổ sung, dựa trên trình tự của người (Hệ thống R&D với số danh mục 305-GR-50) hoặc của một trong các loài khỉ cynomolgus (tạo ra trong chuồng) được tiêm 1 phút trên dòng tế bào thứ hai với mức độ pha loãng đã định để bắt giữ quanh 160 RU kháng nguyên. Dung dịch chứa kháng thể thứ hai được tiêm vào trong cùng một điều

kiện trên cả hai dòng tế bào hoặc chỉ trên dòng tế bào thứ hai. Sau pha bắt giữ, chất đệm hoạt động được tiêm 5 lần (mỗi lần tiêm 90 giây) hoặc 5 nồng độ tăng dần của c208F2 được tiêm (mỗi lần tiêm 90 giây) trên cả hai dòng tế bào. Ở giai đoạn cuối của lần tiêm thứ năm, chất đệm hoạt động được cho qua để xác định tốc độ phân ly. Sau đó, bề mặt được tái tạo bằng cách tiêm glyxin 10mM, Dung dịch đệm HCl có độ pH=1,5 trong 30 giây.

Tín hiệu thu được trên máy tính tương ứng với sự chênh lệch về đáp ứng của dòng tế bào 2 (với IGF-1R đã được bắt giữ) và đáp ứng của dòng tế bào 1 (không có phân tử IGF-1R bất kỳ) (Fig.8).

Đối với mỗi phân tử IGF-1R (người hoặc khỉ cyno), tín hiệu do tiêm c208F2 với khoảng nồng độ tăng dần được hiệu chỉnh bằng cách trừ tín hiệu thu được với 5 lần tiêm chất đệm (đối chiếu kép). Đồ thị cảm biến thu được được phân tích bằng cách sử dụngphần mềm đánh giá Biaevaluation theo mô hình 1:1. Tốc độ động học được đánh giá độc lập (2 tốc độ động học của quá trình gắn kết c208F2 trên mỗi IGF-1R) hoặc thông thường (cùng một tốc độ động học của quá trình gắn kết c208F2 trên IGF-1R của người và của khỉ cynomolgus). Đặc tính phù hợp được đánh giá bởi tỷ lệ Chi2/Rmax nhỏ hơn 0,05 RU.

Tốc độ động học về khả năng gắn kết (xem Bảng 11) được xác định riêng rẽ đối với mỗi IGF-1R là gần bằng nhau và tính phù hợp của cả hai đồ thị cảm biến với cùng một tốc độ động học có chất lượng tốt. Kháng thể c208F2 nhận diện cũng như IGF-1R tái tổ hợp của người và khỉ cynomolgus với hằng số phân ly (KD) khoảng 0,2nM. Ái lực xác định được trong nghiên cứu này tương ứng với ái lực chức năng (hoặc các ái lực) của các kháng thể đối với nồng độ IGF-1R của người và khỉ cynomolgus đã bắt giữ là khoảng 160RU.

Bảng 11

IGF1R	kon [1/M.s]	koff [1/s]	Kd [nM]	Chi2/Rmax
người	1.52E+06	3.40E-04	0.23	0.045
khỉ cynomogus	1.85E+06	3.10E-04	0.17	0.032
Người & Cyno	1.52E+06	3.33E-04	0.22	0.039

Ví dụ 6: Ảnh hưởng nội tại của các kháng thể đã tạo ra trên quá trình phosphoryl hoá IGF-1R

Đã biết rằng các kháng thể có thể tạo ra tác dụng chủ vận khi chúng gắn kết với các thụ thể tyrosin kinaza. Do tác giả sáng chế không thể chọn lọc các kháng thể chủ vận như vậy, nên việc đánh giá quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R được nghiên cứu bằng cách sử dụng các kháng thể thể khảm.

Nhằm mục đích này, các tế bào MCF-7 được ủ qua đêm trong môi trường không chứa huyết thanh. Sau đó, IGF-1 (100nM) hoặc Ab cần thử nghiệm được bổ sung (10μg/mL) trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C. Môi trường này được gạn bỏ và các tế bào được vét trong dung dịch đệm phân giải (độ pH=7,5) chứa dung dịch đệm Tris HCl 10mM (độ pH=7,5), 15% NaCl (1M), hỗn hợp tẩy rửa 10% (10mM Tris-HCl, dung dịch đệm phân giải Igepal 10%) (Sigma Chemical Co.), natri đeoxycholat 5% (Sigma Chemical Co.), 1 bảng TM hoàn toàn cốc-tai ức chế (Roche), bộ cốc-tai ức chế phosphataza 1% II (Calbiochem), trong 90 phút ở nhiệt độ 4°C. Các dịch rửa giải được làm sạch bằng cách ly tâm ở nhiệt độ 4°C, gia nhiệt trong 5 phút ở 100°C và được giữ ở -20°C hoặc được nạp trực tiếp vào gel SDS-PAGE 4-12%. Thực hiện ủ kháng thể sơ cấp trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó ủ với kháng thể thứ cấp đã được liên kết với HRP được thực hiện trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Màng được rửa trong TBST trước khi quan sát protein bằng ECL. Các vết được xác định bằng cách sử dụng phần mềm hình ảnh J. Các trị số phospho-protein được chuẩn hóa bằng GAPDH. Quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R để đáp ứng với IGF-1 được coi là 100% kích thích. Ảnh hưởng của Ab kháng hIGF-1R đối với quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R được xác định bởi % phosphoryl hoá gây ra bởi IGF-1.

Các kết quả được mô tả trong Fig.9 thể hiện trị số trung bình của % pIGF-1R để đáp ứng với Ab kháng IGF-1R thể khảm của 3 thử nghiệm độc lập +/- S.D. so với IGF-1. Như được minh họa, quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R không đáng kể hoặc rất nhỏ (<20%) được phát hiện khi các tế bào MCF-7 được ủ với 10μg Ab kháng IGF-1R.

Ví dụ 7: Ức chế quá trình phosphoryl hoá IGF-1R để đáp ứng với IGF-1 bởi kháng thể kháng hIGF-1R của chuột

Để mô tả đặc điểm của các kháng thể đã chọn, khả năng ức chế quá trình phosphoryl hóa gây ra bởi IGF1 của chúng được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, các tế bào MCF-7 được ủ qua đêm trong môi trường không chứa huyết thanh. Sau đó, các tế bào được ủ trong 5 phút với Ab kháng hIGF-1R của chuột trước khi bổ sung IGF-1 trong

2 phút ở nhiệt độ 37°C. Môi trường này được gạn bỏ và các tế bào được vét trong dung dịch đệm phân giải (độ pH=7,5) chứa dung dịch đệm Tris HCl 10mM (độ pH=7,5), 15% NaCl (1M), hỗn hợp tẩy rửa 10% (10 mM Tris-HCl, dung dịch đệm phân giải Igepal 10%) (Sigma Chemical Co.), natri đeoxycholat 5% (Sigma Chemical Co.), 1 bảng TM hoàn toàn cốc-tai ức chế (Roche), bộ cốc-tai II ức chế phosphataza 1% (Calbiochem), trong 90 phút ở nhiệt độ 4°C. Các dịch rửa giải được làm sạch bằng cách ly tâm ở nhiệt độ 4°C, gia nhiệt trong 5 phút ở 100°C và được giữ ở -20°C hoặc được nạp trực tiếp vào gel SDS-PAGE 4-12%. Thực hiện ủ kháng thể sơ cấp trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó ủ với kháng thể thứ cấp đã được liên kết với HRP được thực hiện trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Màng được rửa trong TBST trước khi quan sát protein bằng ECL. Các vết được xác định bằng cách sử dụng phần mềm hình ảnh J. Các trị số phospho-protein được chuẩn hóa bằng GAPDH. Quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R để đáp ứng với IGF-1 được coi là 100% kích thích. Ảnh hưởng của Ab kháng hIGF-1R đối với quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R được xác định bằng % phosphoryl hoá gây ra bởi IGF-1.

Việc bổ sung m105G2, m101H8 hoặc m9G4, kháng thể không liên quan của chuột, không làm ức chế quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R để đáp ứng với IGF-1 (Fig.10). Việc bổ sung m201F1 làm giảm nhẹ quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R để đáp ứng với IGF-1 (giảm ~40%). Toàn bộ các Ab kháng IGF-1R khác ức chế mạnh quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R để đáp ứng với IGF-1 (giảm > 80%). Các chất ức chế hIGF-1R mạnh nhất của quá trình phosphoryl hóa gây ra bởi IGF1 là m208F2, m212A11 và m214F8 Mab.

Ví dụ 8: Nghiên cứu quá trình nội bào hóa IGF-1R sau khi gắn kết kháng thể kháng IGF-1R đã tạo ra bằng cách phân tích FACS

Các tế bào MCF-7 được ủ với 10μg/mL kháng thể thể khảm ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Sau đó, các tế bào này được rửa và ủ ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ. Số lượng kháng thể gắn kết trên bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp trên máy đo dòng tế bào FacsCalibur Flow (Becton Dickinson). ΔMFI được xác định là mức chênh lệch giữa MFI được đo ở nhiệt độ 4°C và MFI được đo ở nhiệt độ 37°C sau 4 giờ ủ tương ứng với số Ab được nội bào hóa. ΔMFI được thể hiện trong Fig.11A và 11B và Bảng 12. Tỷ lệ phần trăm của quá trình nội bào hóa ở 10μg/mL Ab được tính toán như sau 100*(MFI ở nhiệt độ 4°C -MFI ở nhiệt độ 37°C)/MFI ở nhiệt độ

4°C và được thể hiện trong bảng 11. ΔMFI tối đa được tính toán đối với mỗi kháng thể thể khảm (Fig.11A và 11B) chỉ ra rằng không có mối liên quan giữa nhóm và mức nội bào hóa tối đa.

Bảng 12

Nhóm	Abs	% Nội bào hóa	ΔMFI	EC_{50}
G1	c101H8	75	254	4,2E-09
G1	c201F1	75	222	8,4E-08
G2	c208F2	83	288	1,8E-10
G2	c212A11	80	322	2,7E-10
G2	c214F8	87	403	2,2E-10
G2	c219D6	80	353	4,4E-10
G2	c213B10	85	369	2,3E-10
G3a	c102H8	71	262	7,9E-10
G3a	c110G9	79	309	1,2E-09
G3a	c415A8	78	327	1,2E-09
G3b	c410G4	82	321	3,7E-09
G3b	c414E1	68	229	3,1E-09
G3b	c433H9	79	323	1,1E-09
G4	c105G2	81	260	7,2E-09
G5	c832E5	40	92	2,0E-08

Để xác định xem các kháng thể cũng nhận diện được IGR-1R của khỉ có khả năng nội bào hóa thụ thể này hay không, thì thử nghiệm nội bào hóa tương tự được thực hiện. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 13 đã chứng minh được rằng toàn bộ các kháng thể thử nghiệm có thể gây ra bởi IGF-1R của khỉ nội bào hóa.

Bảng 13

		Ab của chuột		Ab thể khảm	
Nhóm	Ab	ΔMFI	% nội bào hóa	ΔMFI	% nội bào hóa
G1	101H8	73	73	85	73
G1	201F1	66	65	76	60
G2	208F2	53	74	52	67
G2	212A11	83	73	98	75
G2	214F8	76	71	98	72
G2	219D6	80	71	102	74
G2	213B10	84	74	101	73
G3a	102H8	60	55	74	54
G3a	110G9	69	59	93	61
G3a	415A8	89	65	121	68
G3b	410G4	51	49	87	58
G3b	414E1	93	67	59	54
G3b	433H9	80	61	98	63
G4	105G2	68	67	94	72

Động học của việc giảm khả năng gắn kết của kháng thể với bề mặt tế bào được đánh giá tiếp. Nhằm mục đích này, các tế bào MCF-7 được nuôi cấy trên các đĩa 96 giếng

và được ủ với 10μg/mL kháng thể của chuột trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các tế bào này được rửa để loại bỏ kháng thể không gắn kết và trong môi trường ở nhiệt độ 37°C trong 10, 20, 30, 60 hoặc 120 phút. Ở mỗi thời điểm, các tế bào này được ly tâm và sau đó bề mặt đánh dấu trên băng bởi IgG-Alexa488 thứ cấp kháng chuột nhắt để xác định lượng kháng thể còn lại trên bề mặt tế bào. Cường độ phát huỳnh quang đối với mỗi Ab của chuột và đối với mỗi thời điểm được chuẩn hóa bởi tín hiệu ở nhiệt độ 4°C (% IGF-1R còn lại) và phù hợp với sự phân hủy theo hàm số mũ để xác định thời gian bán thải (t1/2). t1/2 được coi là thời gian cần để thu được mức giảm 50% tín hiệu đo được ở nhiệt độ 4°C. Khi được minh họa trong Fig.12A và 12B, nồng độ bề mặt của toàn bộ các Ab của chuột giảm nhanh trong 30 phút đầu và giảm mạnh nhất sau 60 phút ủ (Fig.12A). Thời gian bán thải tính toán được nằm trong khoảng từ 10 đến 18 phút liên quan đến Ab của chuột (Fig.12B). Không thấy mối liên quan giữa sự phân hủy bề mặt kháng thể và nhóm Ab.

Để công nhận mức giảm tín hiệu bề mặt tế bào là do quá trình nội bào hóa Ab chứ không phải do việc loại bỏ thụ thể, các tế bào được ủ với Ab của chuột trong 0, 30 và 60 phút ở nhiệt độ 37°C (Fig.13). Sau đó, các tế bào này được cố định và thẩm thấu hoặc không để xác định kháng thể gắn kết với bề mặt tế bào (khả năng thẩm thấu w/o) và tín hiệu toàn phần của kháng thể tương ứng với Ab được gắn kết tế bào trên bề mặt + được nội bào hóa (cùng với quá trình thẩm thấu). Số Ab được nội bào hóa (bào chất) được xác định như sau: MFI sau khi thẩm thấu - MFI khả năng thẩm thấu w/o. Thử nghiệm này chỉ ra rằng mức giảm Ab gắn kết tế bào trên bề mặt là do việc giảm Ab của bào chất, từ đó chứng minh rằng các Ab được nội bào hóa (Fig.13). Ngoài ra, quá trình thoái biến Ab bắt đầu sau 1 giờ ủ như được chỉ ra bởi mức giảm tín hiệu sau thẩm thấu (toàn phần).

Ví dụ 9: Nghiên cứu quá trình nội bào hóa IGF-1R sau khi gắn kết kháng thể kháng IGF-1R đã tạo ra bởi phân tích đồng tiêu

Để xác nhận tiếp quá trình nội bào hóa của kháng thể, kính hiển vị đồng tiêu được thực hiện để đánh giá khả năng phân bố dưới mức tế bào của các kháng thể theo quá trình di chuyển tế bào. Các tế bào này được ủ với Ab kháng hIGF-1R ở nhiệt độ 37°C, cố định và thẩm thấu. Do đó, các tế bào này được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp Alexa-488 và với kháng thể kháng 1Lamp-1 của thỏ bằng cách sử dụng IgG Alexa 555 kháng thỏ thứ cấp. Trước khi ủ ở nhiệt độ 37°C, Ab 208F2 của chuột được đặt lên màng

chứa các tế bào MCF-7 (Fig.14A) và không đồng định vị bằng chất đánh dấu lysosom, lamp-1 được ghi lại bằng cách sử dụng quá trình nhúng đánh dấu đồng định vị theo phần mềm hình ảnh J. khả năng gắn kết của kháng thể với bề mặt tế bào giảm đột ngột sau 15 phút ủ. Đồng thời với việc giảm khả năng gắn kết của kháng thể với bề mặt tế bào, kháng thể nội bào được phát hiện trong các hạt rỗng. Có thể quan sát được quá trình đồng định vị hiếm gặp bởi lamp-1. Sau 30 phút ủ, kháng thể gắn kết với bề mặt tế bào được phát hiện một cách khó khăn. Tuy nhiên, quá trình đồng định vị Ab vào lysosom được tăng lên. Sau 1h ủ, việc nhuộm Ab nội bào cũng như số lượng đồng định vị bởi lamp-1 giảm xuống. Động học của kháng thể gắn kết với bề mặt tế bào này và quá trình tích lũy nội bào có liên quan đến động học của việc phân hủy bề mặt kháng thể khi đo bởi FACS. Ngoài ra, như được mô tả bởi các nghiên cứu FACS, quá trình phân hủy kháng thể của chuột bắt đầu sau 1 giờ ủ bằng kính hiển vị đồng tiêu.

Quá trình nội bào hóa của toàn bộ các kháng thể kháng hIGF-1R của chuột khác và quá trình đồng định vị của chúng bằng Lamp-1 cũng được đánh giá (Fig.14B).

Ví dụ 10: Ức chế quá trình phân hủy kháng thể bằng cách sử dụng chất ức chế lysosom, Bafilomycin A1

Để xác nhận rằng các kháng thể gắn với lysosom đã phân hủy, các tế bào được xử lý hoặc không được xử lý bằng bafilomycine A1, chất ức chế chức năng lysosom tiềm năng. Sau đó, các tế bào này được ủ với 10μg/mL Ab cần thử nghiệm ở nhiệt độ 4°C, rửa và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Ab nội bào hóa được phát hiện sau khi thẩm thấu tế bào bằng cách sử dụng Ab Alexa 488 kháng IgG của chuột nhắt thứ cấp. Việc bổ sung bafilomycine A1 có thể ngăn ngừa quá trình phân hủy kháng thể nội bào (Fig.15) chứng tỏ rằng Ab được nội bào hóa và phân hủy một cách hiệu quả thành tiêu bào.

Ví dụ 11: Ảnh hưởng của độ pH đối với quá trình gắn kết của kháng thể-IGF-1R và mối liên quan đến độc tính tế bào

Vì các kháng thể được chọn trên cơ sở khả năng nội bào hóa của chúng và quá trình đồng định vị nêu trên với các nội thể sớm trước khi vào khoang lysosom, nên phương pháp thích hợp để chọn lọc các kháng thể nhằm ổn định khả năng gắn kết Ab-hIGF-1R được điều chỉnh liên quan đến môi trường pH và tốt hơn nếu các kháng thể được phân ly theo cách ưu tiên ra khỏi IGF-1R khi độ pH môi trường trở nên axit. Thực

vậy, sự khác biệt cơ bản giữa các nội thể sớm và tiêu bào là độ pH lumen của chúng: trong khoang nội thể, độ pH khoảng 6 trong khi đó khoang lysosom độ pH là khoảng 4,5.

Đã biết rằng ngay khi được nội bào hóa sau khi gắn kết với phối tử (IGF1), hIGF-1R quay lại bề mặt tế bào thông qua quá trình tuần hoàn.

Nếu không gắn kết bởi lý thuyết, giả thuyết nêu trong bản mô tả này là các kháng thể có xu hướng giải phóng ra khỏi đích sớm của chúng ở độ pH axit có thể là đích thích hợp tuần hoàn tới màng và do đó có thể được coi là chất chọn lọc đối với các phương pháp tiếp hợp miễn dịch. Để nghiên cứu xem một số kháng thể theo sáng chế có đặc tính như vậy hay không và có mối liên quan giữa đặc tínhnày với hoạt tính gây độc tế bào hay không, quá trình gắn kết của Mab kháng hIGF-1R của chuột trên dòng tế bào MCF-7 được thực hiện trong các dung dịch đệm ở các độ pH khác nhau. mAb của chuột với nồng độ tăng dần được ủ trên dòng tế bào MCF-7 trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C với độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Sau đó, các tế bào này được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp đã được liên hợp với Alexa 488 trong chất đệm FACS. Các tế bào này được ủ trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối và sau đó được rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết kháng thể kháng hIGF-1R được thực hiện ngay trên các tế bào sống sót mà đã được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua được nhuộm các tế bào đã chết. Trị số gắn kết EC_{50} được biểu thị bằng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

EC_{50} của kháng thể kháng hIGF-1R thuộc nhóm epitop 3B không bị ảnh hưởng đáng kể bởi độ pH (Fig.16). Khả năng gắn kết của Ab kháng hIGF-1R thuộc nhóm epitop 3a thường tăng lên ở độ pH axit. Trái lại, khả năng gắn kết Ab kháng hIGF-1R thuộc nhóm epitop 1, 2 và 4 giảm ở độ pH axit.

Nhằm mục đích xác định xem độ pH axit có ảnh hưởng tích cực tới độc tính tế bào gây ra bởi thể tiếp hợp miễn dịch hay không, thử nghiệm Fab-ZAP trên người đang có trên thị trường (ATS BIO) được sử dụng. Tóm lại, các tế bào MCF7 được nuôi cấy ở 2000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng và để qua đêm để bám dính. Một ngày sau, các tế bào này được xử lý bằng 0,45µg/mL Fab-ZAP và Ab kháng IGF-1R thể khảm với nồng độ tăng dần. Kháng thể đơn dòng c9G4 không gắn kết với bề mặt tế bào được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. Vào ngày thứ 6, khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào CellTiter Glo

Luminesence do Promega (Madison, Wi) cung cấp. Như được minh họa trên Fig.17A, Ab kháng IGF-1R của các nhóm 4 và 5 không tạo ra độc tính tế bào bất kỳ trên MCF-7, trong khi đó độc tính tế bào nhẹ (các nhóm 1, 3a và 3b) đến độc tính tế bào mạnh (nhóm 2) được đo với các nhóm khác. Trêng Fig.17B, việc xác định IC_{50} đã xác nhận được rằng nhóm 2 có khả năng gây độc tế bào cao nhất, từ đó gợi ý rằng các kháng thể này là thích hợp nhất đối với phương pháp ADC (thể tiếp hợp kháng thể dược chất) hoặc phương pháp ATC.

Các kết quả được tóm tắt trên Fig.17 đã chỉ ra rằng trong số 15 mab thể khảm được đánh giá về tác dụng gây độc tế bào mạnh nhất thì c208F2, c219D5, c212A11, c213B10 và c214F8 đạt tới tác dụng này đều thuộc nhóm 2. Tuy nhiên, các kháng thể khác thuộc nhóm 1 và 4 cũng có tính nhạy với độ pH axit đối với việc gắn kết với IGF-1R, là không được xếp vào các chất chọn lọc tốt nhất về độc tính tế bào, từ đó gợi ý rằng đặc tính này có thể là cần thiết nhưng không đủ để giải thích về các đặc tính cụ thể của các kháng thể thuộc nhóm 2. Để hiểu rõ hơn về các đặc điểm cụ thể của nhóm kháng thể này, các nghiên cứu liên quan được thực hiện đối với dữ liệu sẵn có về toàn bộ các kháng thể đã tạo ra. Các kết quả của phân tích này đã gợi ý rằng việc ức chế quá trình of phosphoryl hoá và làm giảm khả năng gắn kết với hIGF-1R trong môi trường pH axit sẽ tạo ra hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất (Fig.18). Thực vậy, nhận thấy rằng 101H8 (G1), 201F1 (G1) và 105G2 (G4) mà khả năng gắn kết của chúng giảm trong môi trường pH axit, nhưng lại là chất ức chế yếu quá trình phosphoryl hoá, có hoạt tính gây độc tế bào yếu. Mặt khác, 102H8 (G3a), 110G9 (G3a), 415A8 (G3a), 410G4 (G3b), 414E1 (G3b) và 433H9 (G3b) là các chất ức chế tiềm năng đối với quá trình phosphoryl hóa gây ra bởi IGF1 nhưng lại không nhạy với sự thay đổi của độ pH hoặc khả năng gắn kết của chúng tăng lên ở độ pH axit, đã chứng minh được rằng chúng chỉ có hoạt tính gây độc tế bào nhẹ trong thử nghiệm Fab-ZAP của người.

Quá trình gắn kết Mab kháng IGF-1R nhân tạo trên dòng tế bào MCF-7 được thực hiện trong các dung dịch đệm ở các độ pH khác nhau. mAb nhân tạo với nồng độ tăng dần được ủ trên dòng tế bào MCF-7 trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C với độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Sau đó, các tế bào này được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trong chất đệm FACS. Các tế bào này được ủ trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết với kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay trên các

tế bào sống sót mà đã được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua được nhuộm các tế bào đã chết. Trị số gắn kết EC_{50} được biểu thị bằng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0). Kháng thể kháng IGF-1R nhân tạo có khả năng gắn kết kém ở độ pH axit như được minh họa trong Fig.32A và 32B.

Ví dụ 12: Đánh giá các dạng nhân tạo của Mab 208F2

12.1. Đánh giá khả năng gắn kết và nội bào hóa của dạng nhân tạo thứ nhất hz208F2 VH3/VL3 (còn được gọi là hz208F2 H026/L024)

Khả năng gắn kết của dạng nhân tạo thứ nhất của cMab 208F2 được đánh giá trên các dòng tế bào MCF-7, COS-7 và NIH 3T3 IR^+. Nồng độ tăng dần của m208F2, c208F2 hoặc hz208F2 VH3VL3 được bổ sung trên mỗi dòng tế bào trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các tế bào này được rửa và khả năng gắn kết của mAb đã được thử nghiệm được thể hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp tương ứng. Để công nhận sự biểu hiện của IR của người trên dòng tế bào đã chuyển nhiễm, dòng GRO5 của kháng thể kháng hIR thương mại được sử dụng và đặc tính nhận diện của nó được minh họa bằng ví dụ trên Fig.19D.

Nhận thấy rằng việc so sánh dạng nhân tạo với dạng của chuột hoặc thể khảm trên các tế bào MCF-7 (Fig.19A) hoặc COS-7 của khỉ (Fig.19B) các tế bào cho các đặc tính tương tự nhau đối với 3 dạng thử nghiệm. Quy trình nhân tạo không cải biến được tính đặc hiệu về khả năng nhận diện của kháng thể được so sánh hoàn toàn với các dạng của chuột và dạng thể khảm khi không xảy ra phản ứng chéo trên thụ thể insulin của người (Fig.19C).

EC_{50} tính toán được của dạng nhân tạo thứ nhất c208F2 trên dòng tế bào MCF-7 của người và dòng tế bào COS-7 của khỉ là tương tự với dạng được xác định với dạng của chuột hoặc dạng thể khảm của 208F2.

Khả năng nội bào hóa của mAb hz208F2 VH3/VL3 được đánh giá bằng cách đo dòng tế bào. Các tế bào MCF-7 được ủ với 10μg/mL kháng thể ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Sau đó, các tế bào này được rửa và ủ ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ. Số kháng thể gắn kết trên bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp. ΔMFI được xác định là mức chênh lệch giữa MFI được đo ở nhiệt độ 4°C và MFI được

đo ở nhiệt độ 37°C sau 4 giờ ủ tương ứng với số Ab được nội bào hóa. ΔMFI được thể hiện trong bảng 14a. Tỷ lệ phần trăm nội bào hóa ở 10μg/mL Ab được tính toán như sau: 100*(MFI ở nhiệt độ 4°C -MFI ở nhiệt độ 37°C)/MFI ở nhiệt độ 4°C và được thể hiện trong bảng 14a. Do đó, hz208F2 VH3/VL3 nhân tạo có đặc tính gắn kết và nội bào hóa tương tự như được xác định với kháng thể 208F2 tương ứng của chuột và thể khảm.

Bảng 14a

	ΔMFI	% nội hóa
m208F2	294	88
C208F2	278	82
Hz208F2 VH3/VL3	344	87

12.2. Đánh giá khả năng gắn kết của các dạng nhân tạo hz208F2 sau này

mAb 208F2 nhân tạo và các đặc tính gắn kết của mười sau biến thể nhân tạo (bao gồm dạng thứ nhất được mô tả trong ví dụ 12.1) được đánh giá. Các đặc tính gắn kết của các biến thể nhân tạo được đánh giá bằng các phân tích FACS trên dòng tế bào bệnh ung thư tuyến vú MCF-7 của người và dòng tế bào Cos-7 của khỉ bằng cách sử dụng nồng độ kháng thể tăng dần. Nhằm mục đích này, các tế bào ($1x10^6$ tế bào/mL) được ủ với kháng IGF-1R kháng thể nhân tạo trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C trong chất đệm FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN3). Sau đó, chúng được rửa 3 lần và được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trước khi rửa 3 lần trong chất đệm FACS. Quá trình gắn kết kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay trên các tế bào sống sót mà đã được xác định bằng cách sử dụng propiđi iođua (nhuộm các tế bào đã chết). EC_{50} của quá trình gắn kết được biểu thị bằng mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích phân hủy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

EC_{50} của các biến thể nhân tạo chỉ ra rằng toàn bộ các biến thể nhân tạo có các đặc tính gắn kết tương đương trên cả dòng tế bào của người lẫn của khỉ.

EC_{50} của kháng thể nhân tạo được tóm tắt trong bảng 14b.

Bảng 14b

	EC_{50} (M)

		MCF-7	Cos-7
Các biến thể nhân tạo	hz208F2 H026/L024	7,09E-10	5,1E-10
	hz208F2 H037/L018	4,9E-10	7,4E-10
	hz208F2 H047/L018	7,7E-10	9,2E-10
	hz208F2 H049/L018	4,9E-10	6,9E-10
	hz208F2 H051/L018	5,7E-10	7,2E-10
	hz208F2 H052/L018	8,4E-10	9,9E-10
	hz208F2 H057/L018	5,8E-10	8,3E-10
	hz208F2 H068/L018	1,1E-09	1,2E-09
	hz208F2 H070/L018	4,6E-10	7,3E-10
	hz208F2 H071/L018	5,5E-10	1,1E-09
	hz208F2 H076/L018	6,5E-10	1,1E-09
	hz208F2 H077/L018	7,7E-10	1,1E-09
	hz208F2 H037/L021	4,8E-10	8,2E-10
	hz208F2 H049/L021	6,6E-10	8,5E-10
	hz208F2 H052/L021	5,7E-10	1,2E-09
	hz208F2 H076/L021	5,8E-10	1,1E-09

12.3. Đánh giá quá trình nội bào hóa của dạng nhân tạo khác hz208F2

Các tế bào MCF-7 được ủ với 10µg/mL kháng thể nhân tạo ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Sau đó, các tế bào này được rửa và ủ ở nhiệt độ 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ. Số kháng thể gắn kết trên bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp trên máy đo dòng tế bào FacsCalibur Flow (Becton Dickinson). ΔMFI được xác định là mức chênh lệch giữa MFI được đo ở nhiệt độ 4°C và MFI được đo ở nhiệt độ 37°C sau 4 giờ ủ tương ứng với số Ab được nội bào hóa. ΔMFI được thể hiện trong bảng 14c. Tỷ lệ phần trăm của nội bào hóa ở 10µg/mL Ab được tính toán như sau: 100*(MFI ở nhiệt độ 4°C -MFI ở nhiệt độ 37°C)/MFI ở nhiệt độ 4°C. Kháng thể nhân tạo hz208F2 H077/L018 có khả năng nội bào hóa IGF-1R một cách đáng kể.

Bảng 14c

	ΔMFI	% nội hóa
hz208F2 H077/L018	468	88

Ví dụ 13: IGF-1R là đích đối với phương pháp tiếp hợp miễn dịch.

Các nghiên cứu IHC được thiết lập để công nhận hIGF-1R là đích đối với phương pháp tiếp hợp miễn dịch. Thực vậy, đích thích hợp đối với phương pháp này đòi hỏi sự biểu hiện đáng kể trên các tế bào của khối u so với các tế bào bình thường. Đặc tính khác của đích thích hợp đối với phương pháp tiếp hợp miễn dịch thường biểu hiện quá mức về tỷ lệ phần trăm đáng kể của quần thể bệnh nhân trong nhiều chỉ định.

Để đánh giá xem hIGF-IR có thể được xem là đích thích hợp đối với phương pháp tiếp hợp miễn dịch hay không, kháng thể đa dòng đang có trên thị trường (AF305-NA do

Hệ thống R&D cung cấp) được mô tả là kháng thể đặc hiệu của miền ngoại bào (EDC) của hIGF-1R so với hIR đã được chọn. Bước thứ nhất của quy trình theo sáng chế là nhằm kiểm tra tính đặc hiệu của AF305-NA đối với hIGF-1R ECD và khi hIR không có khả năng nhận diện. Nhằm mục đích này, một loạt các thử nghiệm ELISA được thực hiện trên cả protein IGF-1R của người lẫn hIR ECD bằng cách sử dụng các trình tự được nêu chi tiết ở trên.

Các kết quả được mô tả trong Fig.20A đã chứng minh được rằng kháng thể đa dòng kháng hIGF-1R nhận diện hữu hiệu hIGF-1R ECD. Kháng thể GR11L (Calbiochem) được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương có đặc tính mong muốn. Như được mô tả bởi nhà cung cấp, Fig.20B chỉ ra rằng AF305-NA không nhận diện được hIR trái ngược với Mab GRO5 kháng hIR (Calbiochem) được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương trong ELISA. Tương tự, việc đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể đa dòng AF305-NA trên các tế bào đã được chuyển nhiễm hIR^+ bằng cách phân tích FACS đã xác nhận được rằng nó không nhận diện được dạng tế bào của hIR (Fig.20D) đồng thời kháng thể GRO5 kháng hIR (Fig.20C) có đặc tính mong muốn trên các tế bào đã được chuyển nhiễm, từ đó chứng minh được rằng chúng biểu hiện hIR ở mức cao. Như mong muốn, GR11L nhận diện hIGF-1R, và được đưa vào thử nghiệm làm kháng thể đối chứng âm, không có tín hiệu bất kỳ trên các tế bào hIR^+ đã được chuyển nhiễm (Fig.20C)

Do kháng thể AF305-NA được công nhận hoàn toàn trong nghiên cứu phân bố hIGF-1R, quy trình IHC được thiết lập trên Discovery Ultra autostainer Ventana. Tóm lại, sau khi cô, quy trình truy vấn kháng nguyên được thực hiện bằng cách sử dụng CC1 tương ứng với dung dịch đệm EDTA có độ pH=8 trong 32 phút ở 96°C. Kháng thể sơ cấp (AF305-NA) được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi rửa, polyme HRP-OMap kháng IgG của dê (Ventana) được ủ trong 16 phút ở nhiệt độ 37°C và sau đó sử dụng chất tạo sắc DAB. Cuối cùng, các mô được nhuộm đếm bằng cách sử dụng Hematoxilin. Sau đó, các tấm kính được đặt vào môi trường Eukitt. Để công nhận quá trình nhuộm IHC, bảng chứa các mô khối u thu được từ quá trình dị ghép được chọn liên quan đến sự biểu hiện *in vitro* của hIGF-1R. Như được thể hiện trên Fig.1, quá trình nhuộm màng bền vững được quan sát trên 3 mô dương tính (MCF-7, NCI-H23 và NCI-H82). Không quan sát thấy quá trình nhuộm màng trên Hs746t được chọn làm khối u âm tính. Để phân tích nhuộm, các tấm kính được quét bằng cách sử dụng máy quét HT do Roche Ventana cung cấo và quá trình IGF-1R được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm Virtuoso (Roche

Ventana). Để phân tích mô, 4 vi trường (FOV) trên mỗi khối u được ghi điểm, khi có thể, với hơn 50 tế bào để tăng cường độ chính xác thống kê của thuật toán. Các mô được ghi điểm +++ (còn được mô tả là 3+), từ ++ đến +++ (còn được mô tả là từ 2+ đến 3+ hoặc là ++/+++), ++ (còn được mô tả là 2+), + (còn được mô tả là 1+) theo thuật toán màng HER2. Việc ghi điểm được xác định theo hướng dẫn thử nghiệm CAP/ASCO là (+) đối với quá trình nhuộm màng yếu hoặc không hoàn toàn, nhuộm màng hoàn toàn với lượng nhỏ hơn 10% tế bào trong mẫu. Số điểm (++) được mô tả là quá trình nhuộm màng hoàn toàn là không đồng đều hoặc yếu với mức phân phối tiếp tuyến rõ ràng với lượng ít nhất 10% tế bào, hoặc nhuộm màng mạnh hoàn toàn với lượng 30% hoặc nhỏ hơn số tế bào của khối u. Số điểm (+++) tương ứng với quá trình nhuộm màng mạnh đồng đều với lượng lớn hơn 30% tế bào của khối u xâm lấn. Khi các khối u được ghi điểm từ (++) đến (+++), nó đưa ra tính không đồng nhất trong mô được phân tích khối u (-) có nghĩa là không biểu hiện hIGF-1R được phát hiện và (c) có nghĩa là chỉ nhuộm bào chất. Quá trình nhuộm bào chất được đặc trưng bởi sự không có mặt quá trình nhuộm màng mà tạo ra các tế bào phân lập.

Sau đó, nghiên cứu sâu rộng được thực hiện trên các mô khỏe mạnh và mô khối u bằng cách sử dụng quy trình nêu trên (Fig.22 A và B).

Đối với các nghiên cứu này, TMA khỏe mạnh và khối u của người do Superbiochips cung cấp được sử dụng để thực hiện nghiên cứu phân bố và lưu hành. Hai chất đối chứng khác nhau được đưa vào trong mỗi chu trình nhuộm tự động. Một chất đối chứng gồm các phần nhau đã biết là đối chứng dương đối với sự biểu hiện IGF-1R của nó và cung cấp cho các mô TMA khỏe mạnh. Dãy chất đối chứng thứ hai gồm 3 tấm kính chứa các mô khối u dị ghép có số điểm 2+ hoặc 3+ (tương ứng là MCF-7 và NCI-H23, NCI-H82). Chất đối chứng cuối cùng này được bổ sung trong mỗi lần nhuộm để kiểm tra sự biểu hiện.

Như mong muốn, nhau thai và mô từ quá trình dị ghép là dương tính đối với hIGF-1R. Quá trình nhuộm màng bền vững được quan sát trong 4 chất đối chứng này. Trong bảng thứ nhất chứa các mô khỏe mạnh của người (Fig.22A), sự phát hiện IGF-1R trên màng nhẹ không bao giờ vượt quá 1+ quan sát được ở đường dạ dày (thực quản, ruột non, đại tràng và trực tràng). Đối với toàn bộ các mô được phân tích khác, không quan sát thấy sự biểu hiện của IGF-1R trên màng. Bảng thứ hai gồm các mô khỏe mạnh của

người (Fig.22B), sự phát hiện của IGF-1R ở màng nhẹ không vượt quá 1+ quan sát được ở cấu trúc thận. Quá trình nhuộm màng bền vững (++) quan sát được trên biểu mô của tuyến tiền liệt và trên biểu mô chuyển tiếp. Ngoại trừ đối với cả hai mô này, quá trình nhuộm màng bền vững cũng không quan sát được. Mô hình biểu hiện bền vững này gợi ý rằng hIGF-1R có thể là đích tốt đối với phương pháp ADC hoặc ATC.

Để xác định khả năng chỉ dẫn tiềm năng đối với thể tiếp hợp miễn dịch hướng tới IGF-1R, các mẫu khối u ở phổi, ngực, đầu và cổ, bàng quang và thận của bệnh nhân được phân tích về sự biểu hiện IGF-1R của chúng bằng cách sử dụng quy trình nêu trên.

Trong số 69 mẫu ở phổi được nghiên cứu, 67 trường hợp có thể giải thích được. Sự biểu hiện IGF-1R được định lượng như được mô tả trên đây. Như được thể hiện trong Fig.23, sự biểu hiện màng bền vững được phát hiện trên nhiều caxinom so với mô liền kề khỏe mạnh là âm tính phù hợp với những gì mà các tác giả sáng chế đã mô tả trên đây đối với các mô khỏe mạnh. Toàn bộ các trường hợp đem phân tích được tóm tắt trong bảng 15. 55% trường hợp ++ hoặc +++ được quan sát bao gồm toàn bộ các phân nhóm bệnh ung thư phổi. Bệnh ung thư tế bào phổi có vảy là các khối u biểu hiện hIGF-1R nhiều nhất chiếm 70% trường hợp ++, ++/+++, hoặc +++ và 43% khối u chỉ có +++ và ++/+++. Các kết quả này là phù hợp với dữ liệu đã công bố được mô tả ở các nhiễm sắc thể đa bội ở mức cao hoặc sự khuếch đại hIGF-1R ở bệnh nhân bị bệnh ung thư tế bào phổi có vảy.

Bảng 15

	Biểu hiện IGF-1R	Mô khỏe mạnh
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa tốt 18/30 T2bN2MO IIIA 103 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa tốt 0/15 T2aNOMO IB 104 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa tốt 0/39 T2aNOMO lB 108 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa tốt 22/22 T3N2MO IIIA 157 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/6 T2aNOMO IB 156 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/30 T2aNOMO IB 102 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/12 T2aNOMO IB 158 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi, được biệt hóa trung bình 2/15 T3N2MO IIIA 159 6	(-)	(-)

Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 5/43 T2aN1MO IIA 1016	(+) đến (++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 0/15 T2aNOMO IB 109 6	(+) đến (++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 2/20 T3N2MO IIIA 113 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 4/61 T2aN1 MO IIA 115 6	(++) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 0/17 T2aNOMO IB 120 6	(++) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 1/46 T2bN1MO IIB 121 6	(++) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 1/43 T2aN1 MO IIA 123 6	(+4-) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 8/28 T2aN2MO IIIA 136 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 0/17 T2aNOM0 IB 137 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 0/19 T2aNOMO IB 139 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 4/32 T2aN2MO IIIA 144 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 0/24 T2bNOMO IIA 148 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa tốt 5/40 T2bN1 M0 IIB 150 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0120 T2aNOMO IB 155 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 1/15 T2bN1M0 IIB 105 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/8 T2aNOMO IB 106 6	(+) đến (++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/16 T3NOMO IIB 110 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/16 T2aNOMO IB 118 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/34 T2bNOMO IIA 119 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 5/18 T2aN2MO IIIA 126 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 1/25 T2aN1M0 IIA 129 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/22 T2bNOMO IIA 130 6	(++) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 3/21 T2aN1M0 IIA 1316	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 2/18 TIbNMMO IIA 134 6	(+) đến (++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 1/33 T2aN1M0 IIA 138 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt	(+++)	(-)

hóa trung bình 1/25 T2aN1M0 IIA 145 6		
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/21 T2aNOMO IB 146 6	(++) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa trung bình 0/28 T3NOMO IIB 1516	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/50 T4NOMO IIIA 132 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 1/3 T2aN2MO IIIA 135 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/22 T3NOMO IIB 140 6	(+) đến (++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/22 T2aNOMO IB 141 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/18 T2bNOMO IIA 128 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/11 T2aNOMO IB 147 6	(+) đến (++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/12 T2aNOMO IB 152 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, được biệt hóa kém 0/14 T3NOMO IIB 153 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở phổi, tế bào hình thoi 0/10 T1 bNOMO IA 122 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi 0/6 T3NOMO IIB 1116	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tuyến ở phổi 0/14 T2aNOMO IB 154 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô thần kinh nội tiết tế bào lớn ở phổi 017 T2aNOMO IB 112 6	(+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô thần kinh nội tiết tế bào lớn ở phổi 0/38 T3NOMO IIB 133 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào lớn ở phổi 0/9 T2aNOMO IB 114 6	(++) đến (+++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào lớn ở phổi 0/14 T1 bNOMO IA 125 6	(4-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô tế bào lớn ở phổi 0/33 T2aNOMO IB 142 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, không nhầy 7/17 T3N2M0 IIIA 107 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, không nhầy 0/8 T2bNOMO IIA 116 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, không nhầy 2/24 T1 aN1 M0 IIA 149 6	(+)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, không nhầy 0/8 T2aNOMO IB 117 6	(-)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, có nhầy 0/24 T2aNOMO IB 124 6	(++)	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, có nhầy 0/9 T3NOMO IIB 127 6	n/a	(-)
Bệnh ung thư biểu mô phế quản-phế nang ở phổi, có nhầy 1/11 T1 bN1 MO IIA 143 6	(+)	(-)

Nghiên cứu khác về sự biểu hiện IGF-1R được thực hiện trên một loạt 10 mẫu bệnh ung thư vú. Các kết quả được thể hiện trên Fig.24 đã chứng minh được rằng IGF-1R được biểu hiện ở mức cao trên các mô bệnh ung thư khi so sánh với các mô khỏe mạnh liền kề. Dữ liệu nhuộm được tóm tắt trong bảng 16 đã chứng minh được rằng 66% trường hợp phân tích là ++, ++/+++ hoặc +++ và 22% trường hợp phân tích là +++ hoặc ++/+++.

Bảng 16

	Biểu hiện (nhuộm màng)	Mô khỏe mạnh
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn T2NOMO	(+++)	(+)
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn T3N2aMO	(+)	c
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn T2N3aMO	n/a	n/a
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn T3NIaMO	(+)	(+)
Bệnh ung thư núm vú xâm lấn kèm theo bệnh ung thư tế bào dạng nhẫn T3N1aM0"	(++) đến (+++)	(+)
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn T3N3aMO	(++)	(+)
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn kết hợp nhiều thùy ở vú T3N2aMO	(++)	c
Bệnh ung thư biểu mô dạng tủy ở vú T3NOMO 5	(+) đến (++)	0 đến (+)
Bệnh ung thư biểu mô dạng tủy không điển hình ở vú T2N1aM0	(++)	0 đến (+)
Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn T2NOM0 *	(++)	0 đến (+)

Cuối cùng, sự biểu hiện quá mức IGF-1R được thể hiện trong một loạt các khối u bao gồm đầu và cổ, bàng quang và thận (Fig.25). Một lần nữa, sự biểu hiện quá mức IGF-1R ở mức cao được thể hiện ở các mẫu khối u so với mô liền kề khỏe mạnh.

Đồng thời, các kết quả này là phù hợp với phương pháp tiếp hợp miễn dịch để điều trị nhiều khối u dương tính với IGF-1R bao gồm phổi, ngực, đầu và cổ, bàng quang và thận.

Ví dụ 14: Xác định hằng số phân ly (K_D) của quá trình gắn kết năm kháng thể thể khảm kháng IGF-1R (c208F2, c213B10, c212A11, c214F8 và c219D6) và phiên bản nhân tạo (VH3/VL3) của 208F2 kháng thể trên IGF-1R tái tổ hợp hòa tan của người

Hằng số phân ly (K_D) của quá trình gắn kết giữa các kháng thể trên IGF-1R tái tổ hợp hòa tan của người được xác định bởi tỷ lệ giữa tốc độ phân ly (k_{off}) và tốc độ liên kết (k_{on}). Thử nghiệm động học được thực hiện trên thiết bị Biacore X100 bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 đã được hoạt hóa bởi kháng thể đơn dòng His kháng Tag của chuột

nhất. kháng thể với nồng độ khoảng 12000 RU được ghép hóa học trên nền carboxymetylđextan bằng cách sử dụng bộ kit amin hóa học.

Thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng bằng 30µL/phút bằng cách sử dụng dung dịch đệm HBS-EP+ (GE Healthcare) là dung dịch đệm pha loãng hoạt động và dung dịch đệm pha loãng mẫu.

Sơ đồ động học về một chu trình được sử dụng để xác định tham số động học của quá trình gắn kết kháng thể kháng IGF-1R trên IGF-1R tái tổ hợp hòa tan của người được bắt giữ bởi hai trình tự đánh dấu 10 histiđin có đầu tận cùng C.

1- Dung dịch chứa phiên bản tái tổ hợp hòa tan của tetrame khác loại IGF-1R của người: các chuỗi 2α và miền ngoại bào chứa các chuỗi 2β được biểu hiện với dấu 10-His có đầu tận cùng C bổ sung (Hệ thống R&D với số danh mục 305-GR-50) được tiêm trong một phút trên dòng tế bào thứ hai ở nồng độ 10µg/mL. Trị số trung bình 587 RU (với độ lệch chuẩn 24 RU) của thụ thể hòa tan được bắt giữ ở mỗi chu trình trong số 24 chu trình để thực hiện nghiên cứu này.

2- Sau pha bắt giữ, chất đệm hoạt động được tiêm 5 lần (mỗi lần tiêm 90 giây) hoặc 5 nồng độ tăng dần của một trong sáu kháng thể được tiêm (mỗi lần tiêm 90 giây) trên cả hai dòng tế bào. Ở giai đoạn cuối của lần tiêm thứ năm, chất đệm hoạt động được cho qua trong 5 phút để xác định tốc độ phân ly.

3- Sau đó, bề mặt được tạo ra cùng với việc tiêm glyxin 10mM, dung dịch đệm HCl có độ pH=1,5 trong 45 giây.

Tín hiệu thu được trên máy tính tương ứng với mức chênh lệch giữa đáp ứng của dòng tế bào 2 (với IGF-1R đã được bắt giữ) và đáp ứng của dòng tế bào 1 (không có phân tử IGF-1R bất kỳ).

Đối với mỗi IGF-1R, tín hiệu do việc tiêm một kháng thể với khoảng nồng độ tăng dần được hiệu chỉnh bằng cách trừ tín hiệu thu được với 5 lần tiêm chất đệm (đối chiếu kép) xem Fig.26.

Đồ thị cảm biến thu được được phân tích bởi phần mềm đánh giá Biaevaluation với mô hình 1:1.

Bốn thử nghiệm được thực hiện đối với mỗi kháng thể bằng cách sử dụng hai khoảng nồng độ khác nhau: 40, 20, 10, 5 và 2,5 nM đối với hai thử nghiệm thứ nhất và:

24, 12, 6, 3 và 1,5 nM đối với hai thử nghiệm cuối cùng được thực hiện đối với mỗi kháng thể.

Đối với 6 kháng thể cần thử nghiệm trong thử nghiệm này, các dữ liệu thử nghiệm làm phù hợp với giếng với mô hình 1:1 với trị số k_{off} có ý nghĩa khi nồng độ cao hơn được xác định là nồng độ cố định và bốn nồng độ khác được tính toán (xem Fig.27).

Hằng số phân ly (K_D) được tính toán bởi tỷ số: k_{off}/k_{on} và thời gian bán thải của phức hợp được tính toán bởi tỷ số: $Ln(2)/k_{off}$ được thể hiện trên Fig.28 và 29. Chúng tương ứng với trị số trung bình của bốn thử nghiệm độc lập thực hiện đối với mỗi các kháng thể. Các thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn (n=4) của các trị số.

Hằng số phân ly nằm trong khoảng từ 10 đến 100 pM. Kháng thể c208F2 có ái lực yếu hơn (cao hơn hằng số phân ly) so với h-IGF-1R (với K_D khoảng 75 pM) và phiên bản nhân tạo của nó ít nhất là tốt như phiên bản thể khảm (với K_D khoảng 60 pM). Bốn kháng thể thể khảm kháng IGF-1R khác có ái lực tương tự như hIGF1-R (với K_D khoảng 30 pM). Sự khác nhau về ái lực được liên kết chủ yếu với tốc độ phân ly hoặc thời gian bán thải thu được của phức hợp. Đối với 208F2, thời gian bán thải của phức hợp này nằm trong khoảng từ 2 đến 3 giờ đối với phiên bản thể khảm và phiên bản nhân tạo (VH3/VL3). Đối với bốn kháng thể thể khảm khác, thời gian bán thải trung bình nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,4 h.

Các tham số động học phân ly rất chậm này được liên kết rõ ràng với cấu trúc hóa trị hai của các kháng thể có khả năng gắn kết đồng thời bởi hai Fab của chúng với hai phân tử h-IGF-1R liền kề. Trong trường hợp này, nồng độ của các phân tử IGF-1R đã được bắt giữ có thể ảnh hưởng tới tốc độ phân ly. Ái lực xác định trong nghiên cứu này tương ứng với ái lực chức năng (hoặc các ái lực) của các kháng thể đối với nồng độ h-IGF-1R đã được bắt giữ khoảng 600 RU. Sự khác nhau của KD là cao hơn gấp 3 lần quan sát được giữa dữ liệu nêu trên (bảng 10) và các trị số được thể hiện trong ví dụ 13 được liên kết với mức thay đổi nồng độ của hIGF-1R đã được bắt giữ (600RU so với 160 RU ở ví dụ 5).

Ví dụ 15: Xác định gốc đặc hiệu IGF-1R của chuột nhắt có khả năng ngăn ngừa quá trình gắn kết của c208F2 bằng cách sử dụng các dạng hòa tan của các protein tái tổ hợp h/m IGF-1R thể khảm

Quá trình gắn kết của các dạng hòa tan của các protein tái tổ hợp h/m IGF-1R thể khảm trên các thử nghiệm của kháng thể c208F2 được thực hiện trên thiết bị Biacore X100 bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 đã được hoạt hóa bởi kháng thể đơn dòng IgG Fc kháng người của chuột nhắt. Hơn 10.500 RU của kháng thể kháng Fc được ghép hóa học trên nền carboxymetylđextan của cả hai dòng tế bào bằng cách sử dụng bộ kit amin hóa học.

Thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng bằng 30µL/phút bằng cách sử dụng dung dịch đệm HBS-EP + làm dung dịch hòa tan hoạt động và dung dịch hòa tan mẫu.

Thử nghiệm được thiết lập như sau:

1-Dung dịch chứa c208F2 ở nồng độ 10µg/mL được tiêm trong 60 giấy trên dòng tế bào thứ hai.

2-Cấu trúc IGF-1R được thử nghiệm tương ứng với dịch nổi trên bề mặt cô đặc của môi trường nuôi cấy được pha loãng 10 lần trong dung dịch đệm hoạt động. Một cấu trúc được tiêm ở mỗi chu trình trong 120 giây với thời gian trễ 120 giây.

3-Cả hai dòng tế bào được tái tạo bằng cách tiêm glyxin 10mM, dung dịch đệm HCl có độ pH=1,7 trong 30 giây.

Fig.30 thể hiện sự chồng lặp của hai chu trình. Các dịch nổi trên bề mặt h-IGF-1R và m-IGF-1R được tiêm tương ứng trong chu trình thứ nhất và thứ hai. Thử nghiệm này rõ ràng đã chỉ ra rằng m-IGF-1R không có khả năng gắn kết với vị trí của kháng thể c208F2 đã dùng để xác định nồng độ bắt giữ c208F2 và nồng độ gắn kết với IGF-1R được chỉ định bởi các mũi tên hai đầu.

Miền ngoại bào của IGFR (không có tín hiệu peptit) bao gồm 805 và 806 axit amin tương ứng đối với trình tự của người và chuột nhắt.

869 gốc (96%) là giống nhau trong cả hai cấu trúc. 37 gốc của trình tự của chuột nhắt là khác so với trình tự tương ứng của người. Một gốc khác nhau tương ứng với một khe.

Như được thể hiện trên Fig.31, trong số 7 cấu trúc thể khảm được thử nghiệm 4 (C1 (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.83), C4(trình tự như nêu trong SEQ ID NO.86), C7(trình tự như nêu trong SEQ ID NO.88) và C8(trình tự như nêu trong SEQ ID NO.89))

gắn kết cũng như h-IGF-1R với c208F2, thì có 3 cấu trúc (C2(trình tự như nêu trong SEQ ID NO.84), C3(trình tự như nêu trong SEQ ID NO.85) và C6(trình tự như nêu trong SEQ ID NO.87)) là mIGF-1R (trình tự như nêu trong SEQ ID NO.91) do không gắn kết với c208F2.

Quá trình gắn kết của C1 và quá trình không gắn kết của C2 cho thấy rằng gốc đặc hiệu của chuột nhắt có thể phong bế quá trình gắn kết của c208F2 nằm ở nửa đầu N của protein. Do đó, mười một axit amin đặc hiệu cuối cùng ở chuột nhắt nằm ở nửa đầu tận cùng C không ảnh hưởng tới quá trình gắn kết của c208F2.

Quá trình không gắn kết của C3 chứng tỏ rằng sự phân bố chủ yếu của một gốc đặc hiệu của chuột nhắt là Arg thay vì His ở vị trí 494. Kết quả này được xác nhận bằng quá trình không gắn kết của C6 chứa hai gốc đặc hiệu của chuột nhắt: His494>Arg và Ser501>Trp.

Quá trình gắn kết của C4 gợi ý rằng chỉ có gốc Trp đặc hiệu của chuột nhắt ở vị trí 501 của IGF-1R thể khảm này là không có mối liên quan đến quá trình không gắn kết của C2 và C6.

Quá trình gắn kết của C7 gợi ý rằng không có gốc nào trong số 17 gốc đặc hiệu của chuột nhắt có mặt trong cấu trúc này có ảnh hưởng bất kỳ tới khả năng phong bế quá trình gắn kết của c208F2.

Tương tự, quá trình gắn kết của C8 ngoại trừ 4 gốc đặc hiệu khác của chuột nhắt.

Thể đột biến C12 của IGF1R của người thể hiện ba gốc của chuột nhắt trong miền L1, tức là Phe ở vị trí 28 thay vì Tyr, Ile ở vị trí 125 thay vì Val và Leu ở vị trí 156 thay vì Met gắn kết với c208F2 với hằng số phân ly cận nanomol. Thử nghiệm này xác nhận rằng miền L1 không liên quan đến quá trình gắn kết của kháng thể hoặc ít nhất rằng 3 vị trí biệt hóa được trình tự của chuột nhắt và người không liên quan đến sự không xuất hiện của quá trình gắn kết của kháng thể trên dạng IGF1R của chuột.

Như được thể hiện trên Fig.33, hz208F2 không có khả năng gắn kết với 120 RU thể đột biến C29 (Asp491>Ala) của dạng hòa tan của h-IGF1R đã được bắt giữ trên chip cảm biến CM5 bởi trình tự đánh dấu 6-His ở đầu tận cùng C của nó (hình thoi màu trắng) trong khi đó dung dịch tương tự của kháng thể này rõ ràng là gắn kết (hình thoi màu đen) với 170 RU dạng kiểu hoang của thụ thể hòa tan. Đối với His 494, Asp 491 là axit amin

quan trọng đối với ái lực của hz208F2 đối với IGF1R. Dữ liệu tinh thể đồ chỉ ra rằng cả hai gốc này đều có mặt trên bề mặt của thụ thể trong miền FnR3.

Đồng thời, các kết quả này đã chứng minh được rằng hz208F2 gắn kết với miền FnR3 của IGF-1R và epitop được nhận diện bởi kháng thể này chứa His 494 và Asp 491 là axit amin quyết định đối với quá trình gắn kết của kháng thể.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể nội bào hóa kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó, trong đó kháng thể này được chọn từ:

a. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

b. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11;

c. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.12; và

d. kháng thể chứa ba vùng CDR chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 và ba vùng CDR chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11.

2. Kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể thể khảm.

3. Kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân tạo.

4. Kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa:

a. chuỗi nặng có vùng CDR-H1, vùng CDR-H2 và vùng CDR-H3 có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3, và vùng FR1, vùng FR2 và vùng FR3 có nguồn gốc từ IGHV1-46*01 dòng mầm của người (SEQ ID NO.44), và vùng FR4 có nguồn gốc từ IGHJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID NO.46); và

b. chuỗi nhẹ có vùng CDR-L1, vùng CDR-L2 và CDR-L3 có trình tự tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.11, và vùng FR1, vùng FR2

và vùng FR3 có nguồn gốc từ IGKV1-39*01 dòng mầm của người (SEQ ID NO.45), và vùng FR4 có nguồn gốc từ IGKJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID NO.47).

5. Kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể này chứa:

a. miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.33 chứa ít nhất một đột biến ngược, trong đó ít nhất một đột biến ngược này được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95; và

b. miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35 chứa ít nhất một đột biến ngược, trong đó ít nhất một đột biến ngược này được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 và 87.

6. Thể lai của chuột được chọn từ thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 và I-4774 tương ứng được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur Pháp vào ngày 30 tháng 05 năm 2013, ngày 26 tháng 06 năm 2013, ngày 26 tháng 06 năm 2013, ngày 24 tháng 04 năm 2013 và ngày 26 tháng 06 năm 2013.

7. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết IGF-1R nội bào hóa của nó theo điểm 1, được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào.

8. Dược phẩm chứa kháng thể nội bào hóa kháng IGF-1R theo điểm 1 và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

9. Dược phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 7 và ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dẫn thuốc dược dụng.

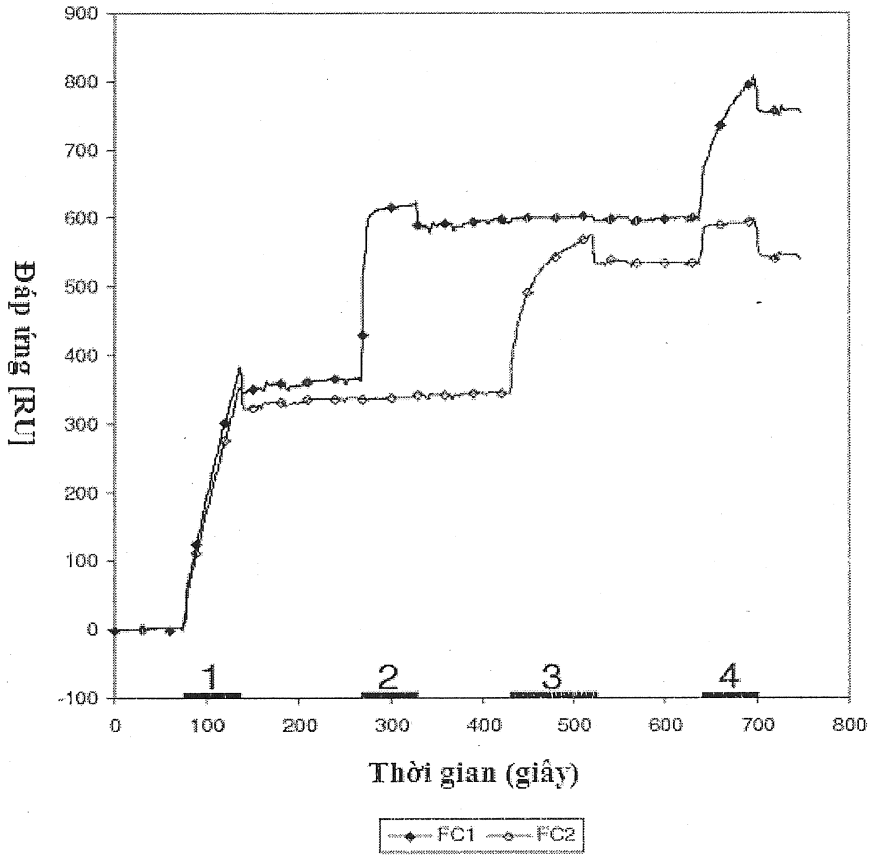

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
Đáp ứng [RU]
1
2
3
4
0
100
200
300
400
500
600
700
800
Thời gian (giây)
FC1
FC2

Fig.1

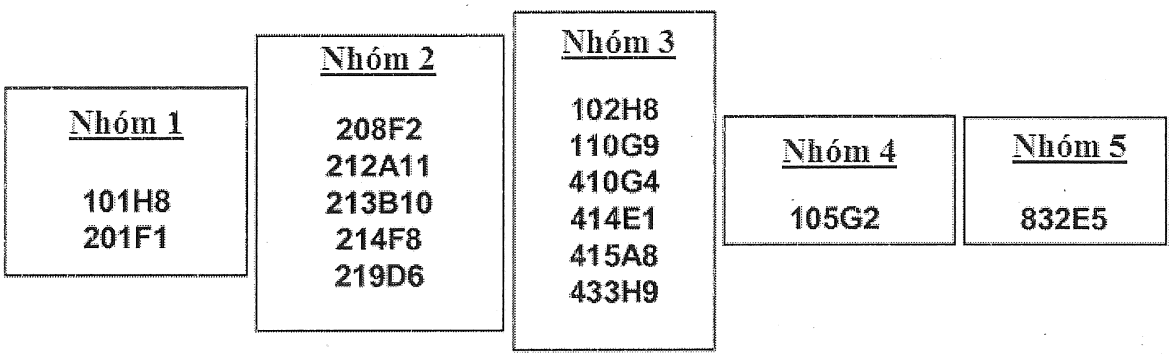

Nhóm 1
101H8
201F1
Nhóm 2
208F2
212A11
213B10
214F8
219D6
Nhóm 3
102H8
110G9
410G4
414E1
415A8
433H9
Nhóm 4
105G2
Nhóm 5
832E5

Fig.2

Fig.3A

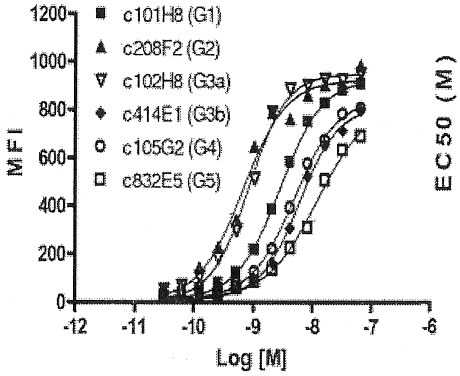
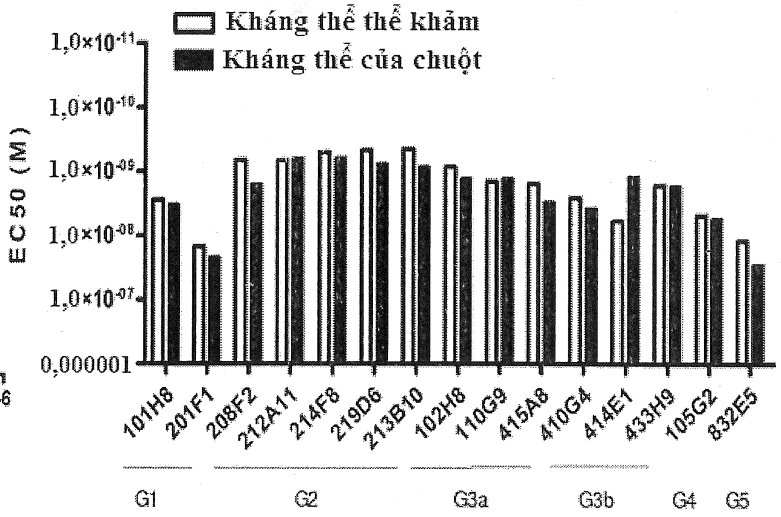


Fig.3B



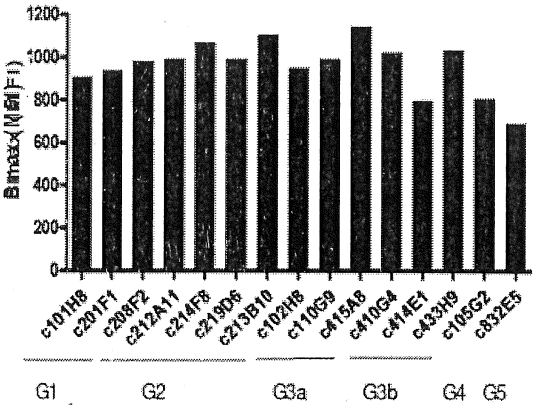


Fig.3C

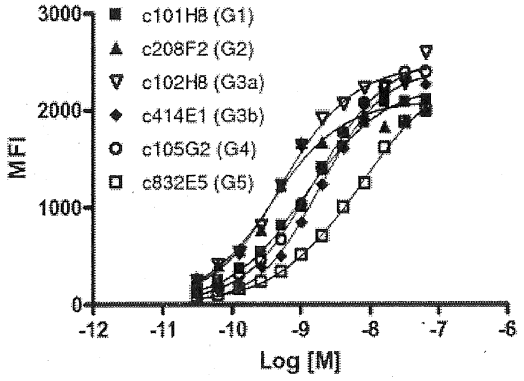


Fig.4A

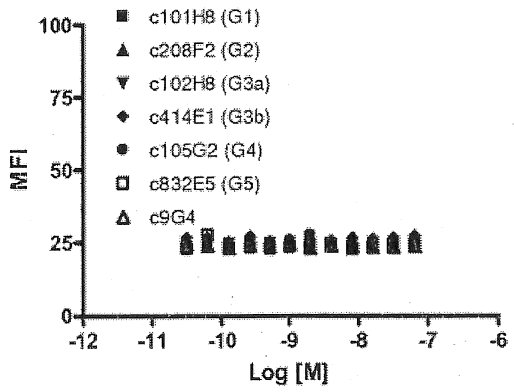


Fig.4B

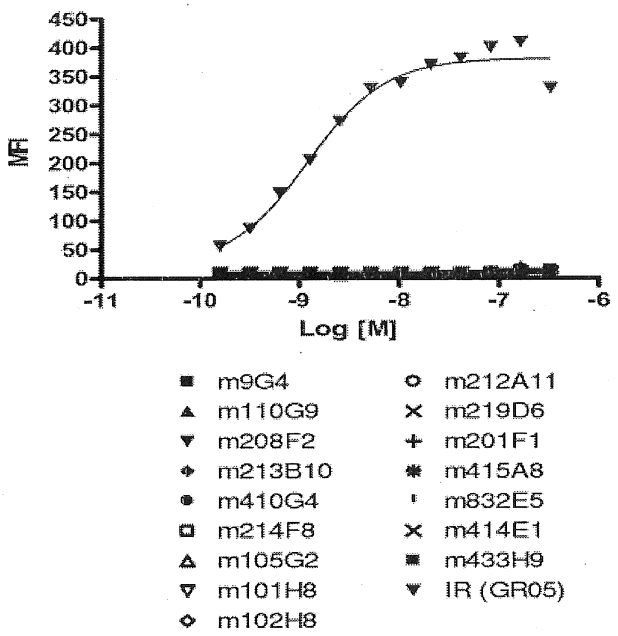


Fig.5A

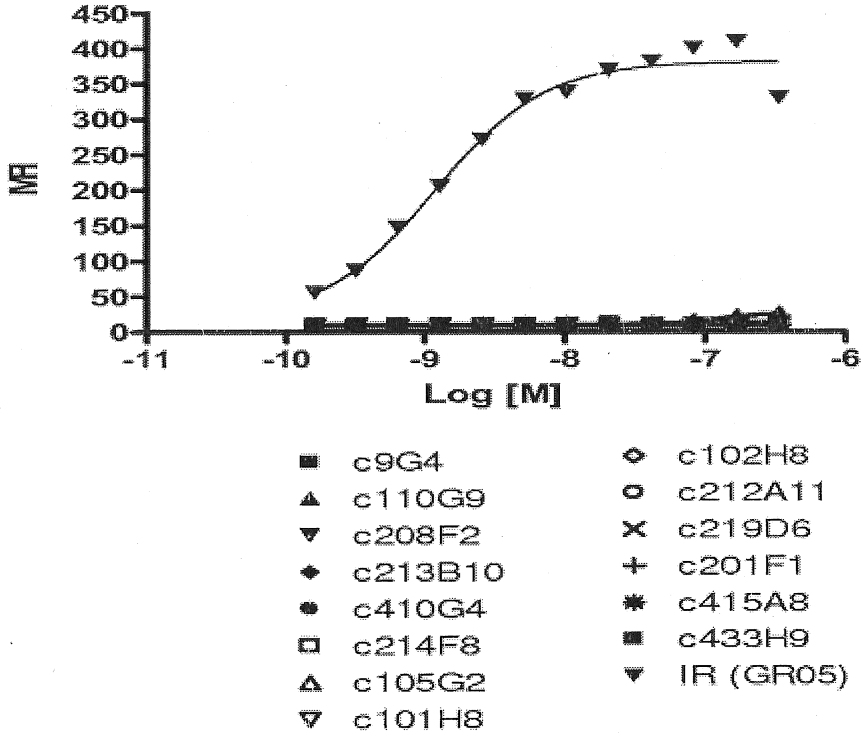

450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
MR
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M]
c9G4
c110G9
c208F2
c213B10
c410G4
c214F8
c105G2
c101H8
c102H8
c212A11
c219D6
c201F1
c415A8
c433H9
IR (GR05)

Fig.5B

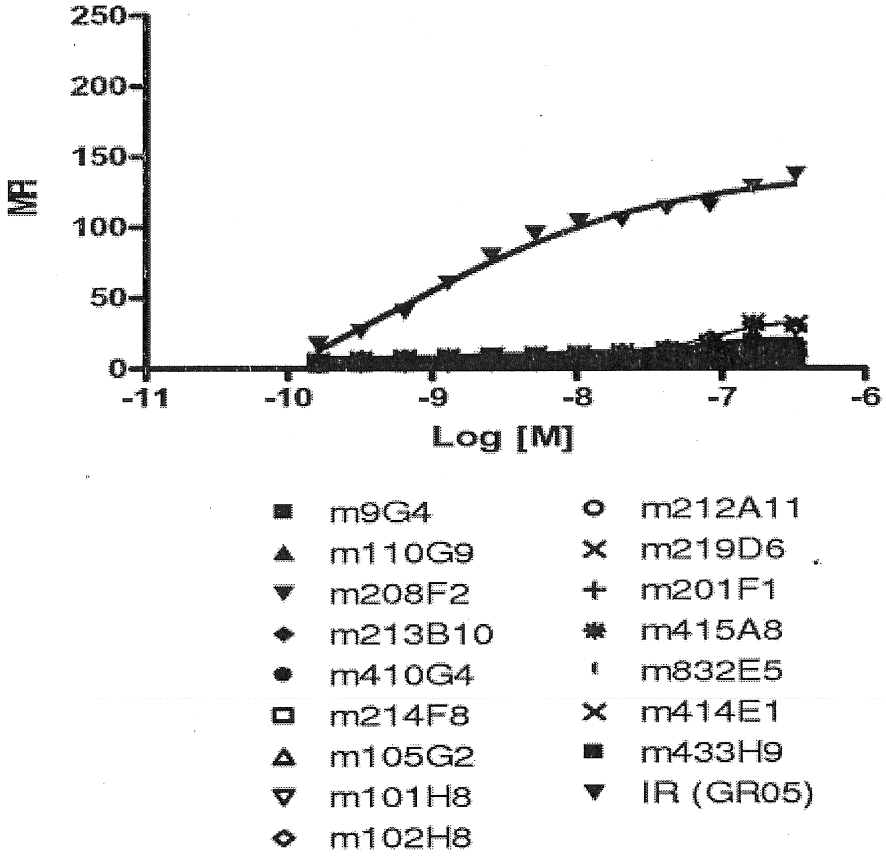

250
200
150
100
50
0
MR
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M]
m9G4
m110G9
m208F2
m213B10
m410G4
m214F8
m105G2
m101H8
m102H8
m212A11
m219D6
m201F1
m415A8
m832E5
m414E1
m433H9
IR (GR05)

Fig.6

Fig.7A

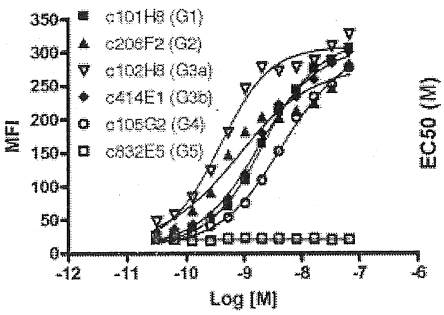


Fig.7B

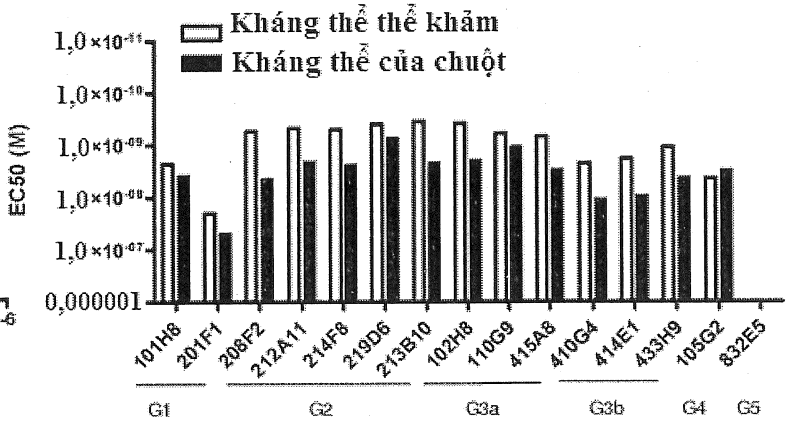
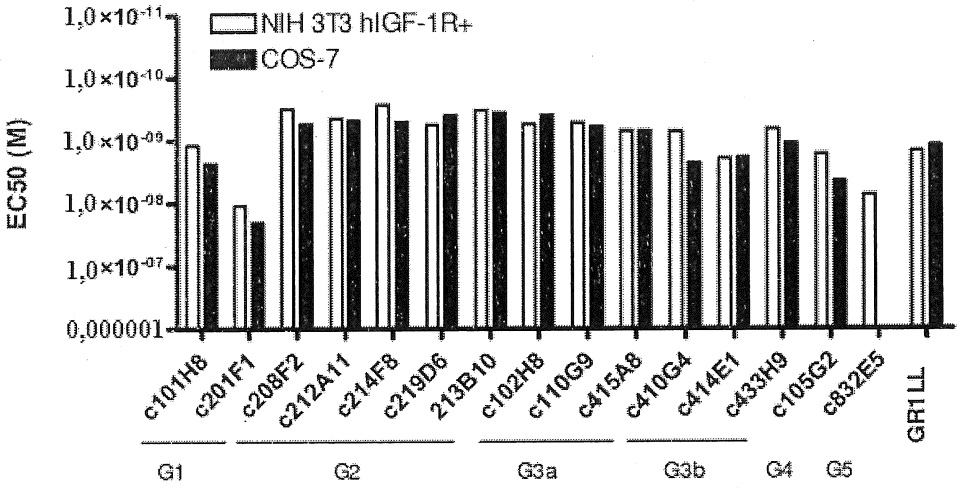


Fig.7C



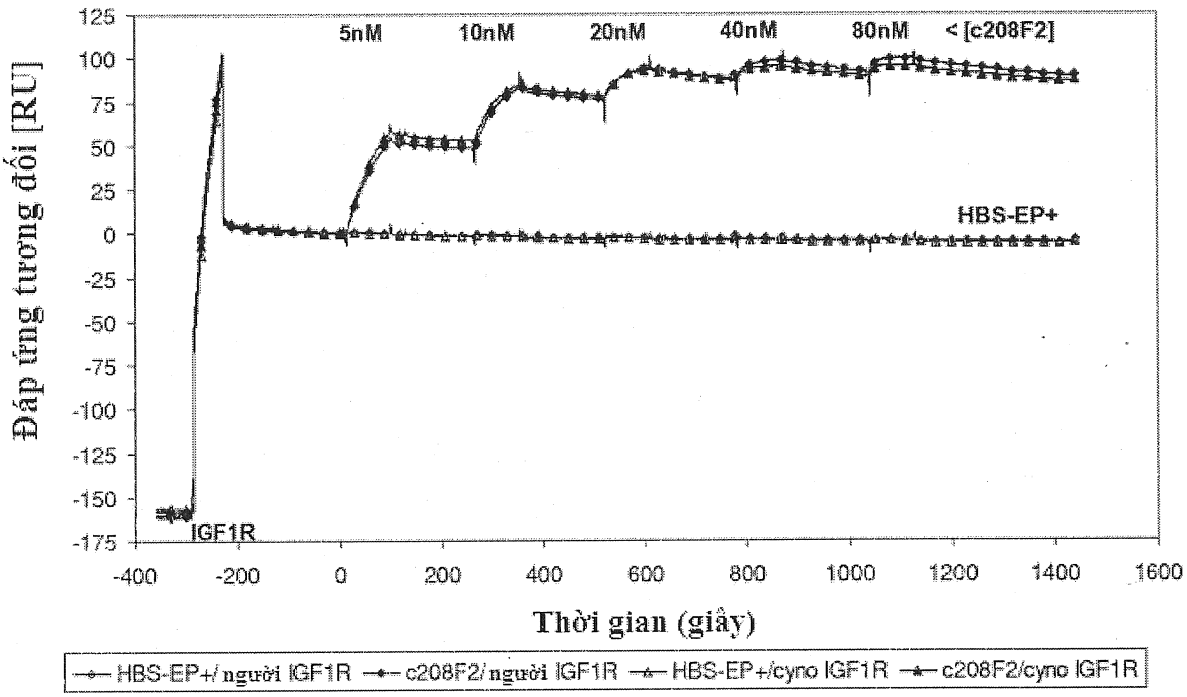

Đáp ứng tương đối [RU]
125
100
75
50
25
0
-25
-50
-75
-100
-125
-150
-175
5nM
10nM
20nM
40nM
80nM
< [c208F2]
HBS-EP+
IGF1R
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
Thời gian (giây)
HBS-EP+/ người IGF1R
c208F2/ người IGF1R
HBS-EP+/cyno IGF1R
c208F2/cyno IGF1R

Fig.8

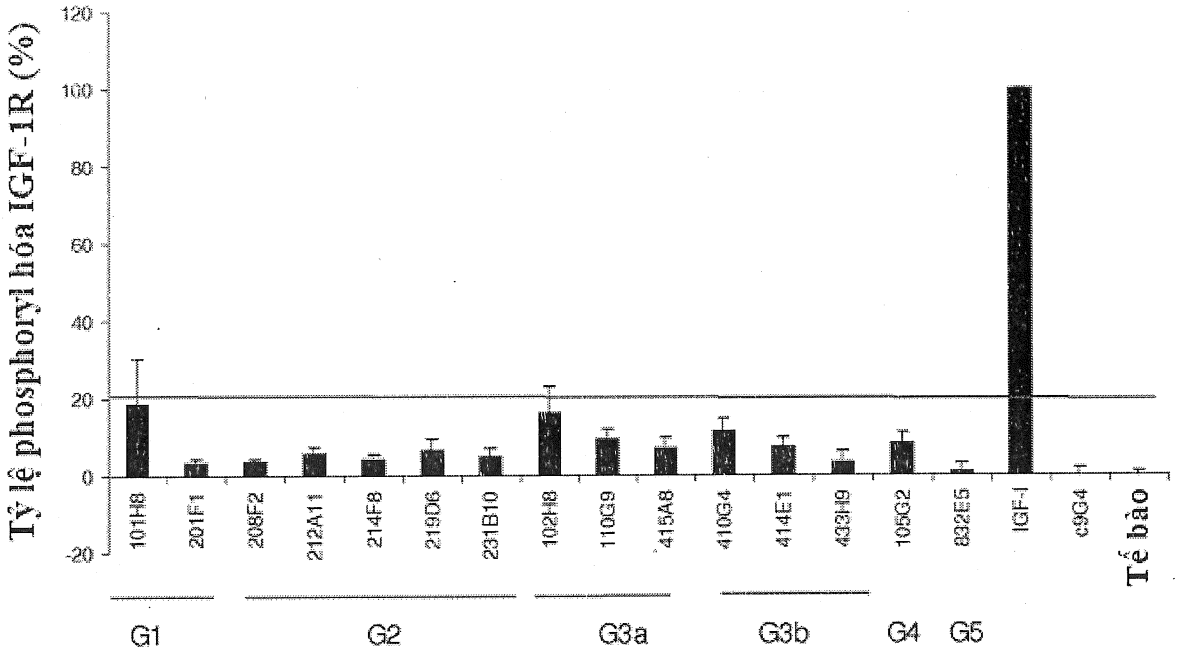

Tỷ lệ phosphoryl hóa IGF-1R (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
101H8
201F1
208F2
212A11
214F8
219D6
231B10
102H8
110G9
415A8
410G4
414E1
433H9
105G2
832E5
IGF-I
c9G4
Tế bào
G1
G2
G3a
G3b
G4
G5

Fig.9

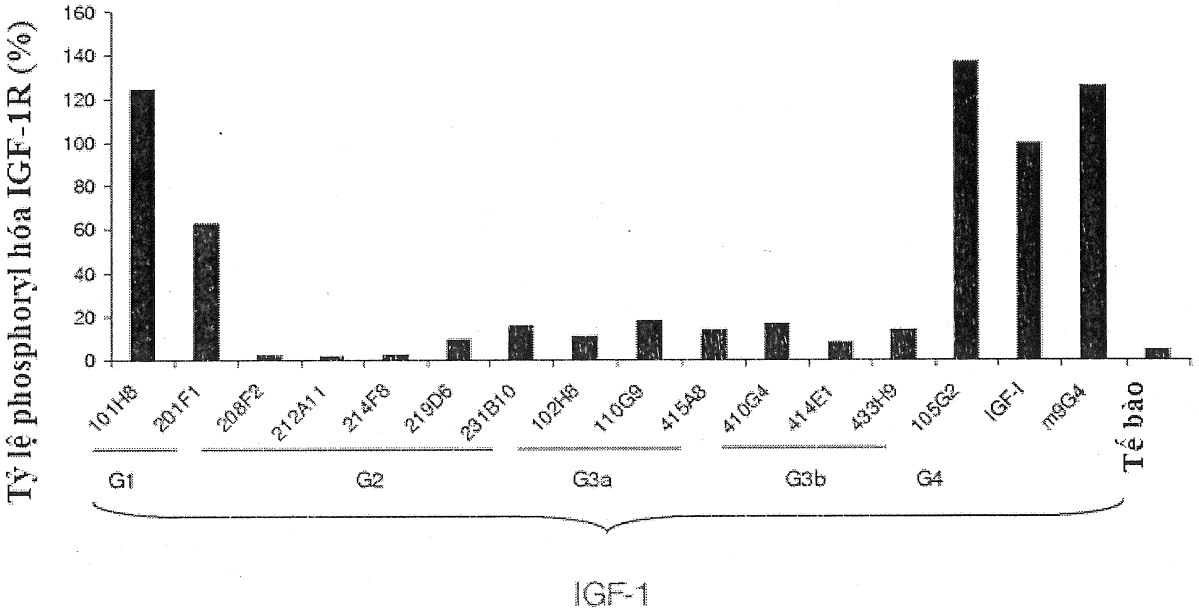

Tỷ lệ phosphoryl hóa IGF-1R (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
101H8
201F1
208F2
212A11
214F8
219D6
231B10
102H8
110G9
415A8
410G4
414E1
433H9
105G2
IGF-I
m9G4
Tế bào
G1
G2
G3a
G3b
G4
IGF-1

Fig.10

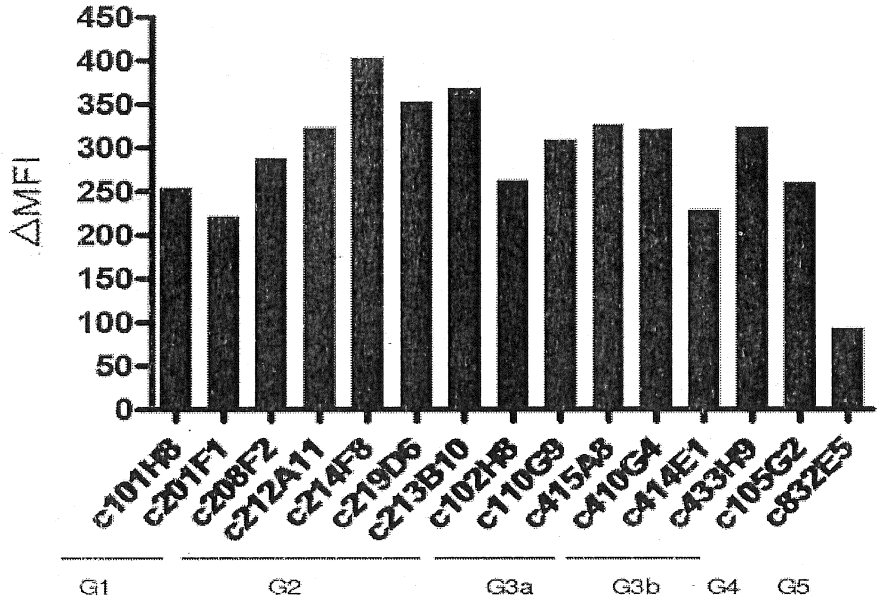


Fig.11

Fig.12A

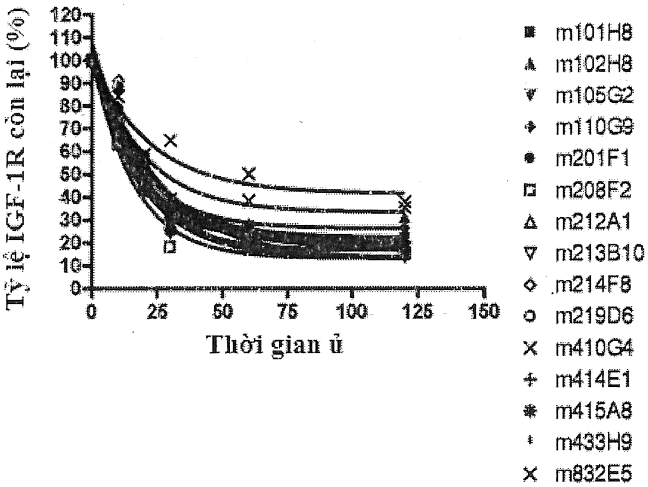


Fig.12B

	Kháng thể	Thời gian bán thải
G1	m101H8	11,89
G1	m201F1	14,83
G2	m208F2	11,11
G2	m212A11	14,3
G2	m214F8	16,81
G2	m219D6	17,85
G2	m213B10	12,83
G3a	m102H8	12,16
G3a	m110G9	13,56
G3a	m415A8	12,92
G3b	m410G4	13,57
G3b	m414E1	13,01
G3b	m433H9	14,88
G4	m105G2	10,75
G5	m832E5	15,87

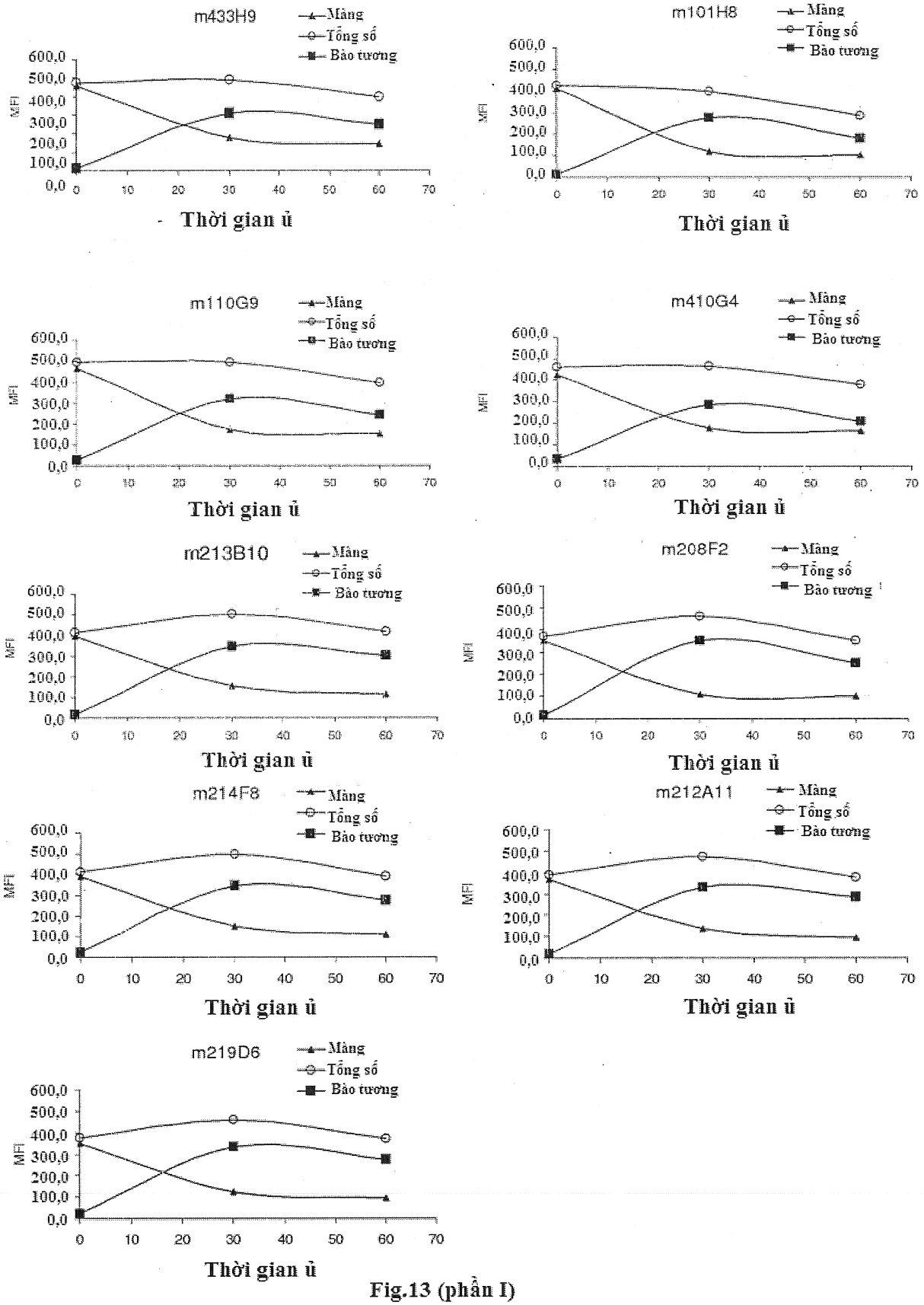

m433H9
m101H8
m110G9
m410G4
m213B10
m208F2
m214F8
m212A11
m219D6
Màng
Tổng số
Bào tương
MFI
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0
10
20
30
40
50
60
70
Thời gian ủ

Fig.13 (phần I)

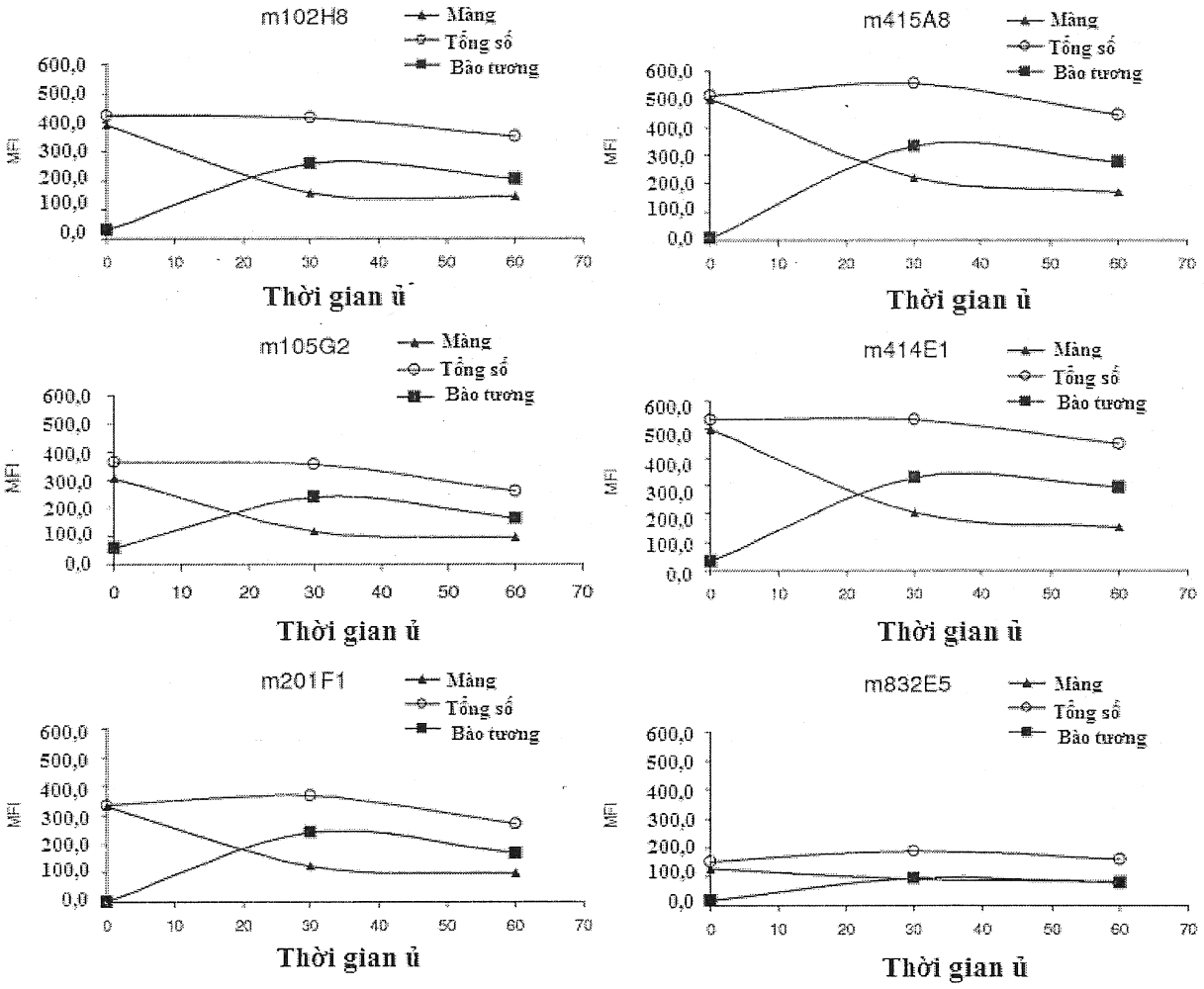


Fig.13 (phần II)

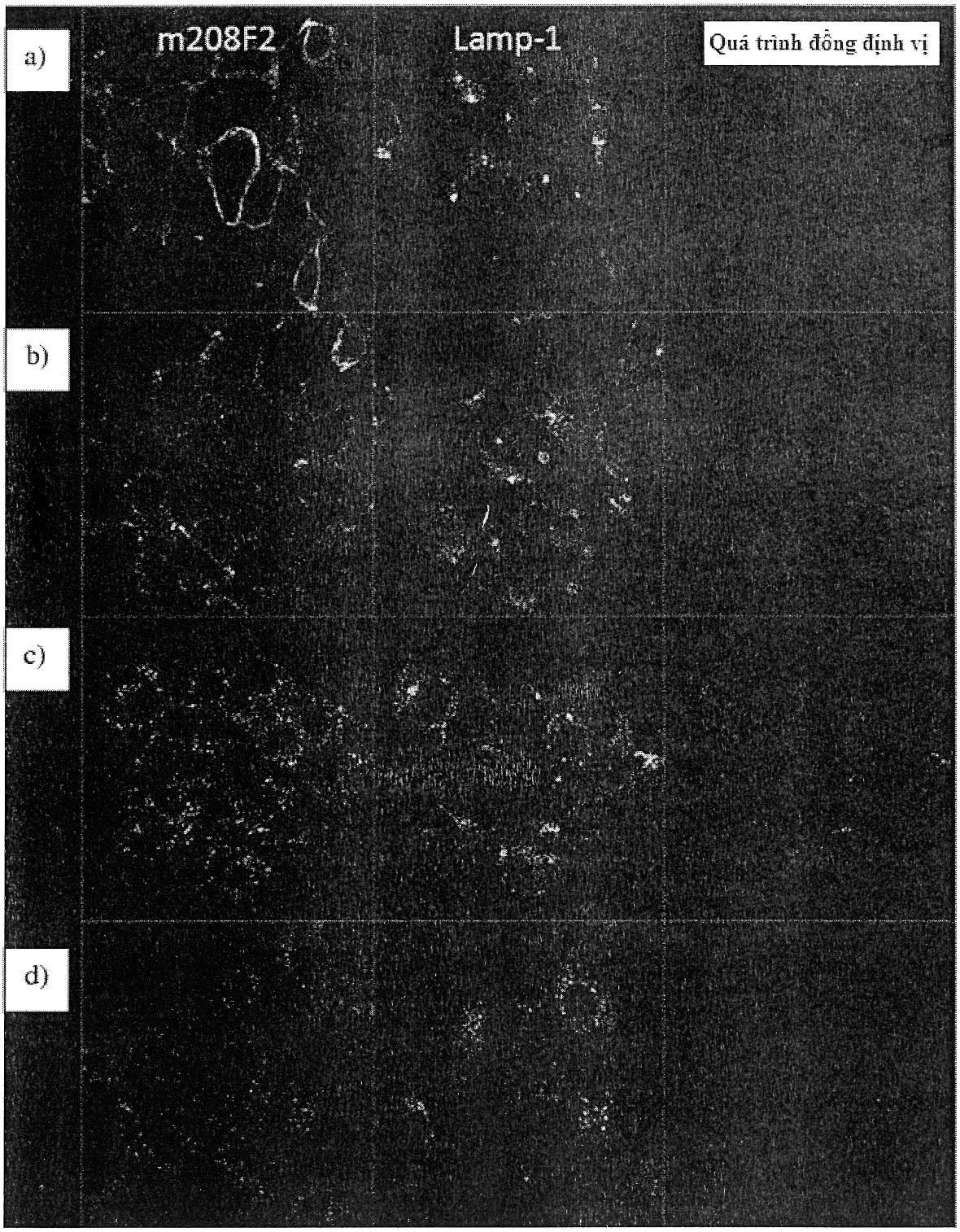


Fig.14A

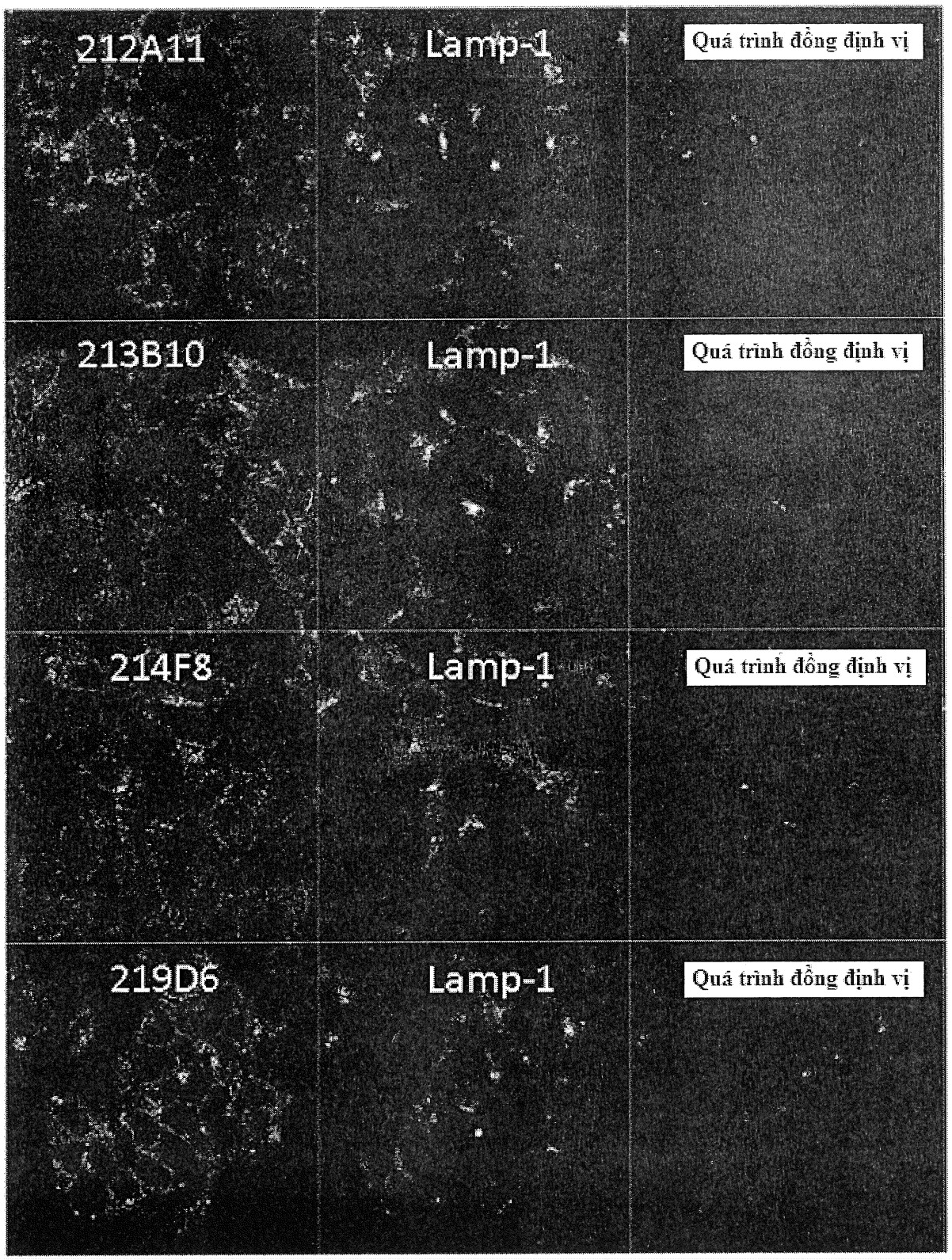


Fig.14B (phần I)

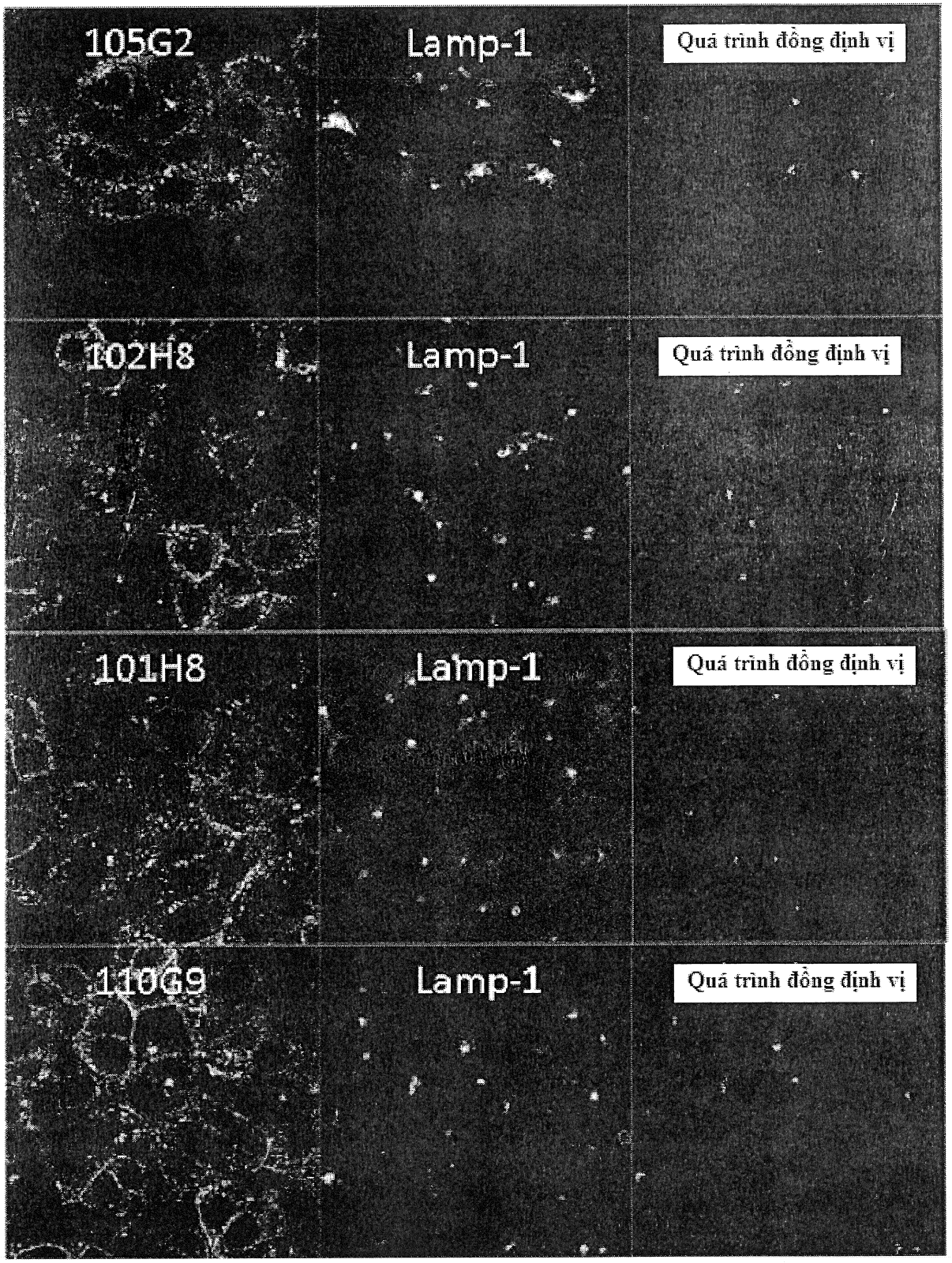


Fig.14B (phần II)

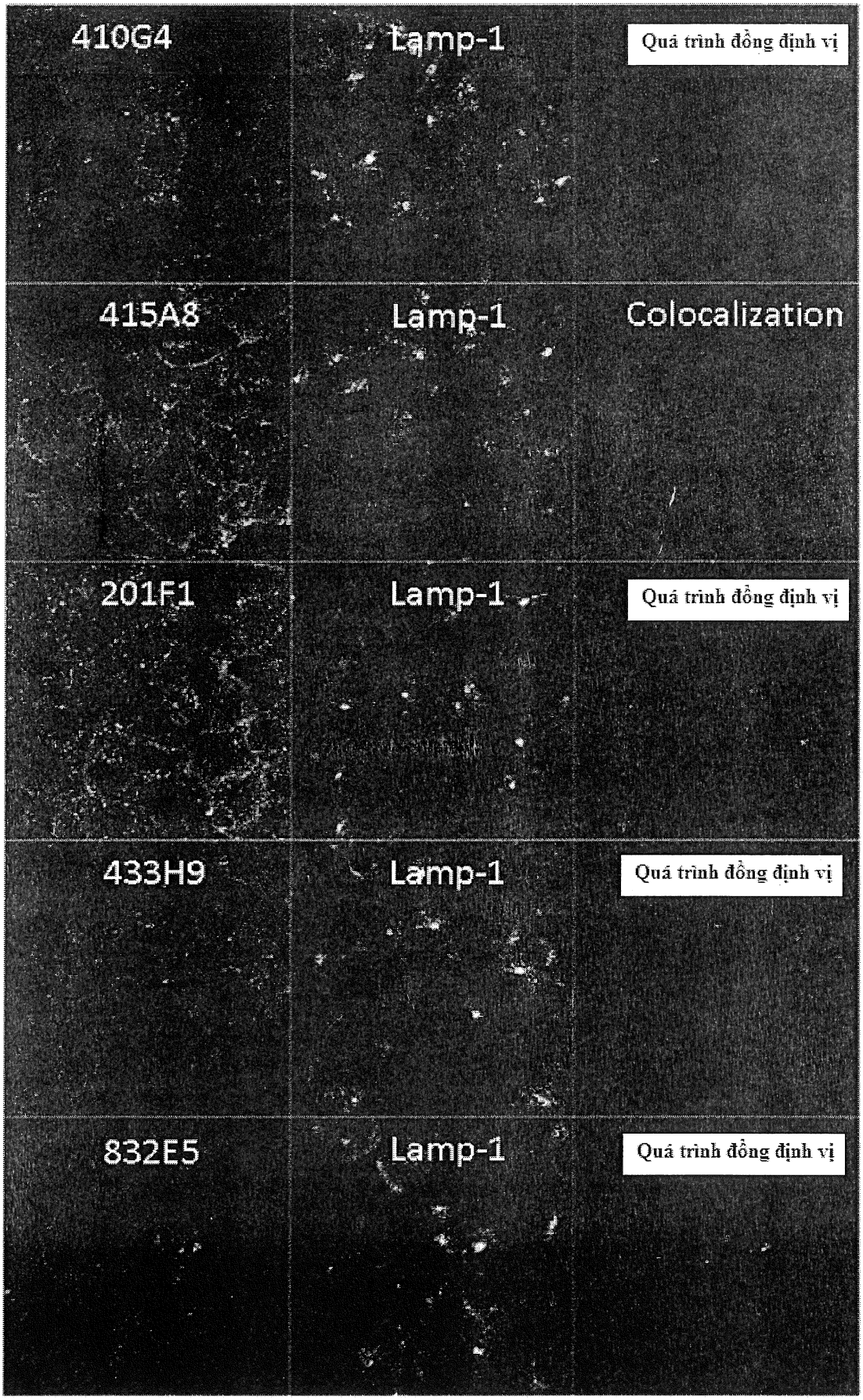


Fig.14B (phần III)

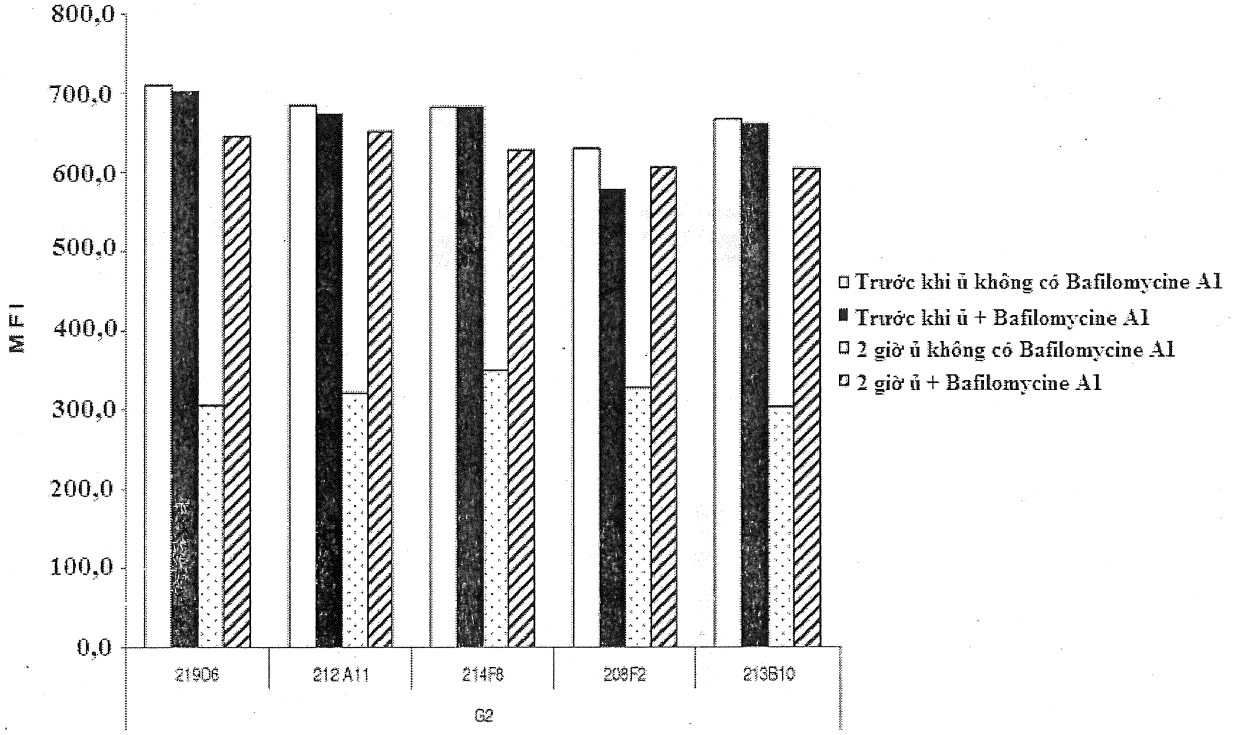

800,0
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
MFI
219D6
212A11
214F8
209F2
213B10
G2
Trước khi ủ không có Bafilomycine A1
Trước khi ủ + Bafilomycine A1
2 giờ ủ không có Bafilomycine A1
2 giờ ủ + Bafilomycine A1

Fig.15

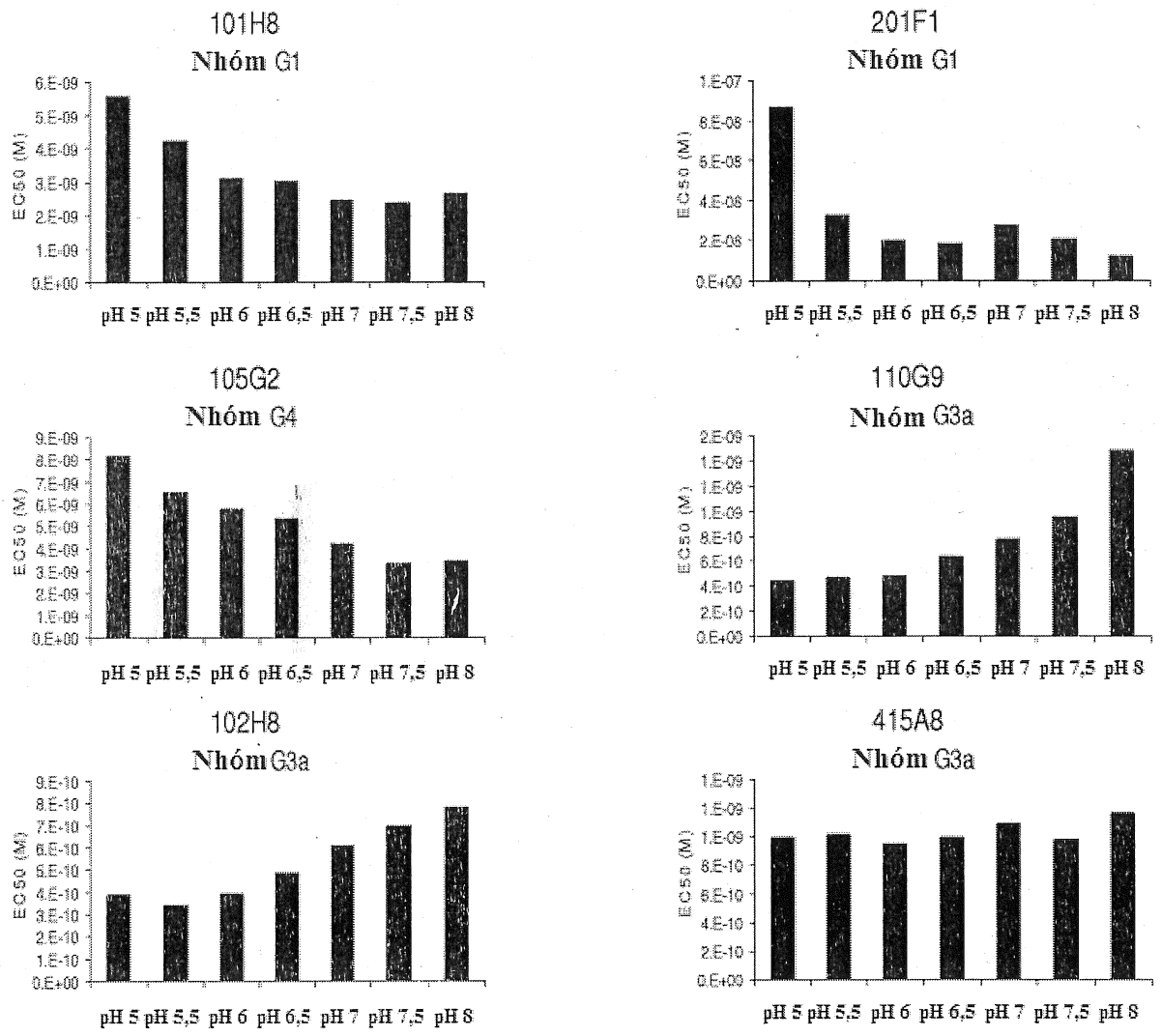

101H8
Nhóm G1
EC50 (M)
6.E-09
5.E-09
4.E-09
3.E-09
2.E-09
1.E-09
0.E+00
pH 5 pH 5,5 pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8
201F1
Nhóm G1
EC50 (M)
1.E-07
8.E-08
6.E-08
4.E-08
2.E-08
0.E+00
pH 5 pH 5,5 pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8
105G2
Nhóm G4
EC50 (M)
9.E-09
8.E-09
7.E-09
6.E-09
5.E-09
4.E-09
3.E-09
2.E-09
1.E-09
0.E+00
pH 5 pH 5,5 pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8
110G9
Nhóm G3a
EC50 (M)
2.E-09
1.E-09
1.E-09
1.E-09
8.E-10
6.E-10
4.E-10
2.E-10
0.E+00
pH 5 pH 5,5 pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8
102H8
Nhóm G3a
EC50 (M)
9.E-10
8.E-10
7.E-10
6.E-10
5.E-10
4.E-10
3.E-10
2.E-10
1.E-10
0.E+00
pH 5 pH 5,5 pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8
415A8
Nhóm G3a
EC50 (M)
1.E-09
1.E-09
1.E-09
8.E-10
6.E-10
4.E-10
2.E-10
0.E+00
pH 5 pH 5,5 pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8

Fig.16 (phần I)

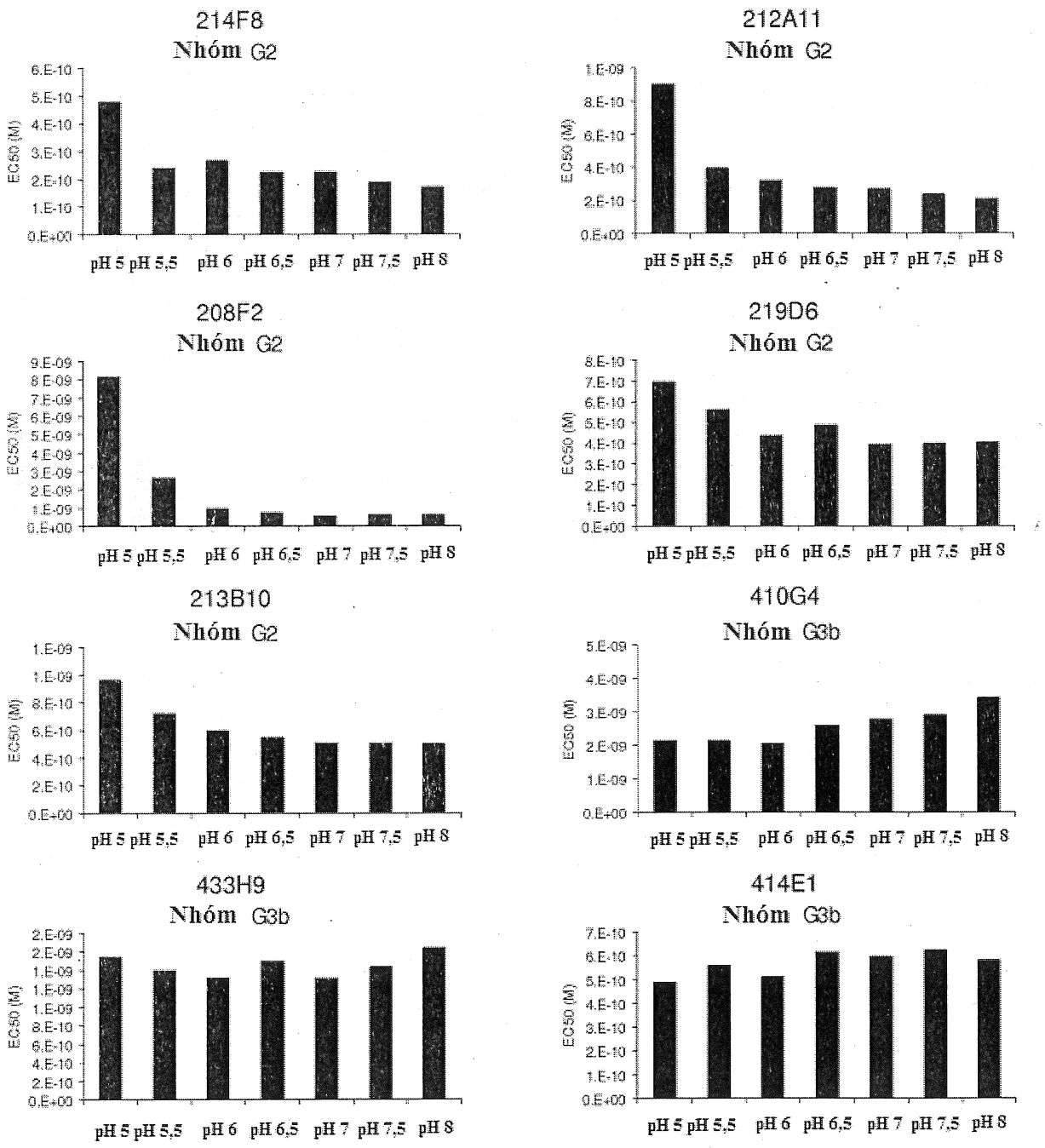


Fig.16 (phần II)

Fig.17A

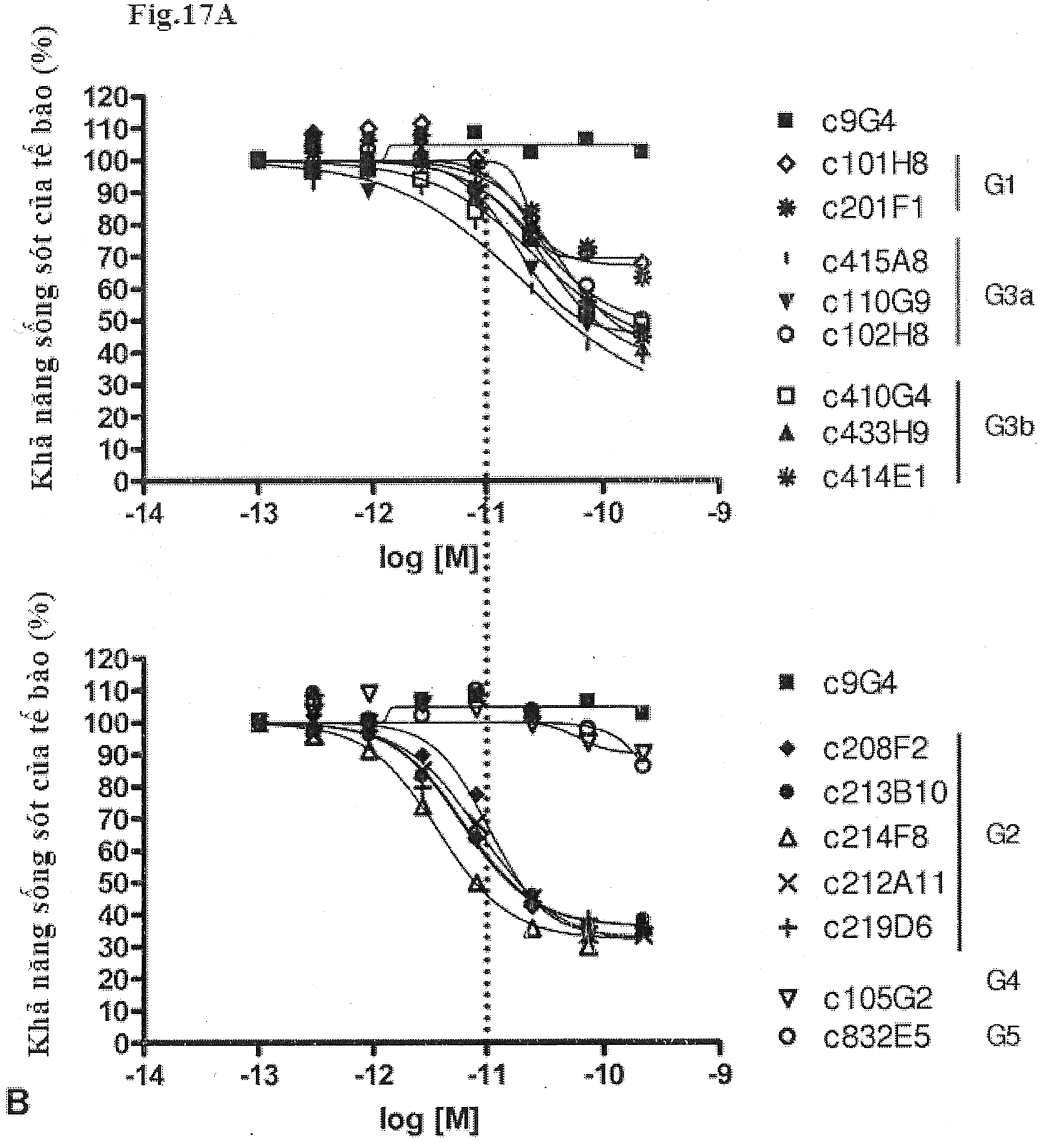
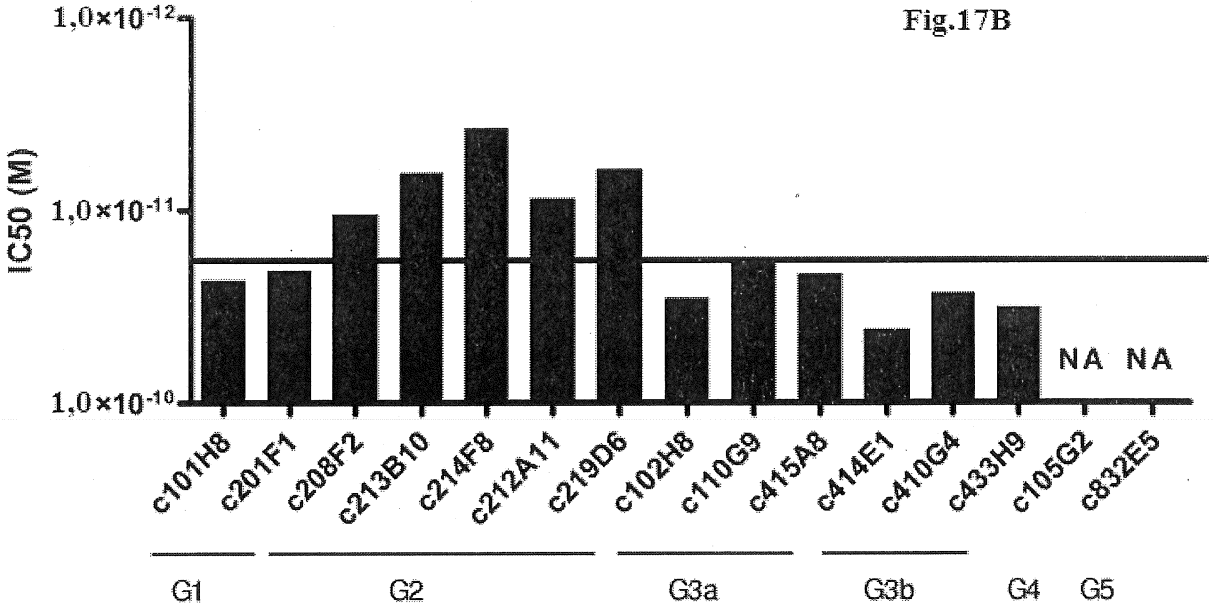


Fig.17B



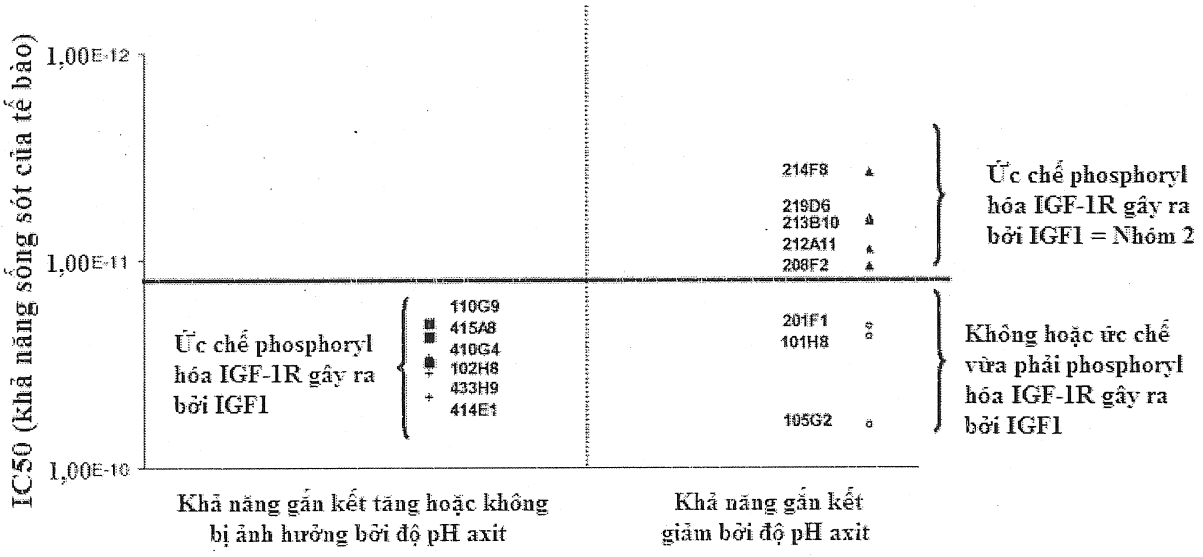

IC50 (khả năng sống sót của tế bào)
1,00E-12
1,00E-11
1,00E-10
Ức chế phosphoryl hóa IGF-1R gây ra bởi IGF1
110G9
415A8
410G4
102H8
433H9
414E1
214F8
219D6
213B10
212A11
208F2
201F1
101H8
105G2
Ức chế phosphoryl hóa IGF-1R gây ra bởi IGF1 = Nhóm 2
Không hoặc ức chế vừa phải phosphoryl hóa IGF-1R gây ra bởi IGF1
Khả năng gắn kết tăng hoặc không bị ảnh hưởng bởi độ pH axit
Khả năng gắn kết giảm bởi độ pH axit

Fig.18

Fig.19A

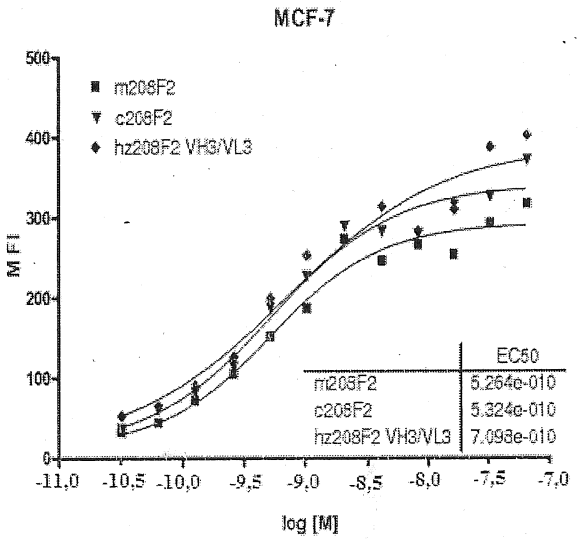
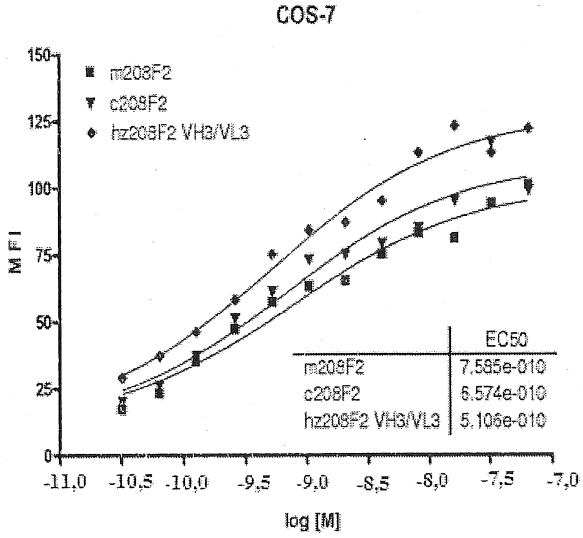


Fig.19B



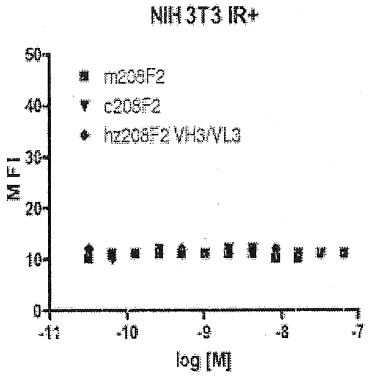


Fig.19C

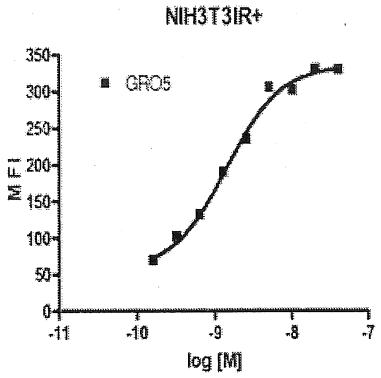


Fig.19D

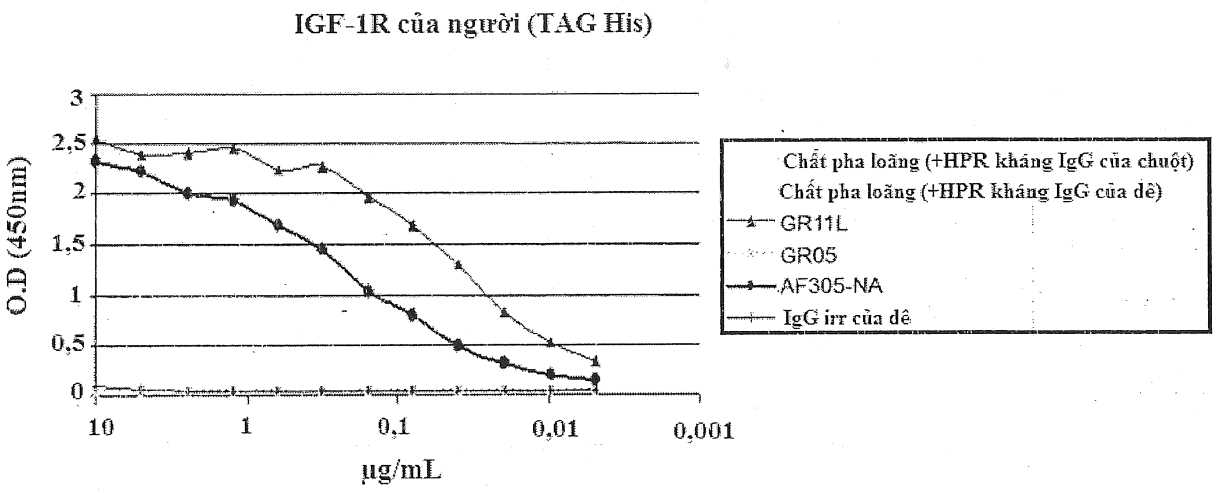


Fig.20A

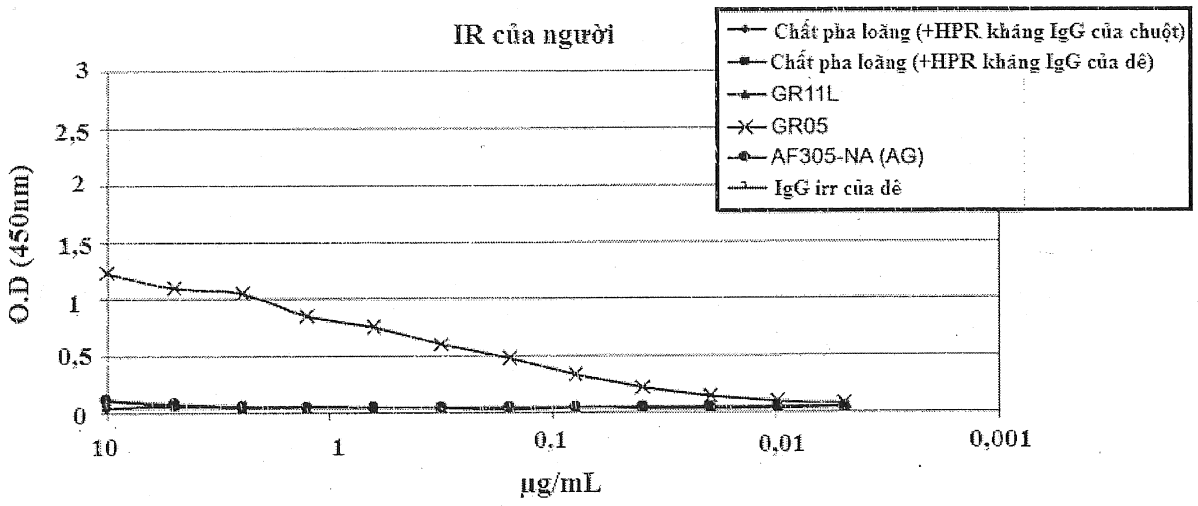


Fig.20B

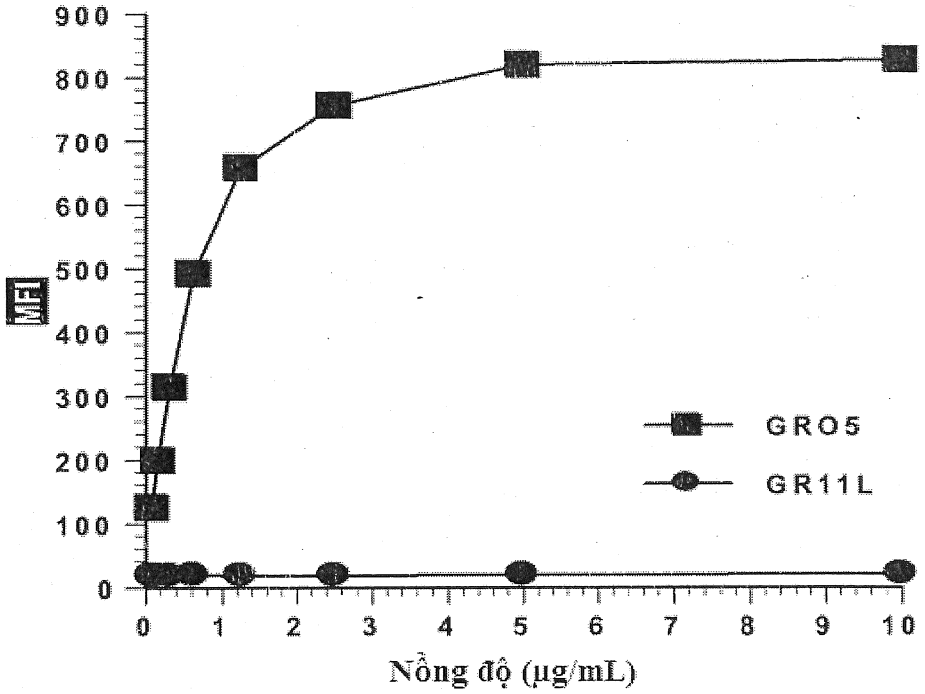


Fig.20C

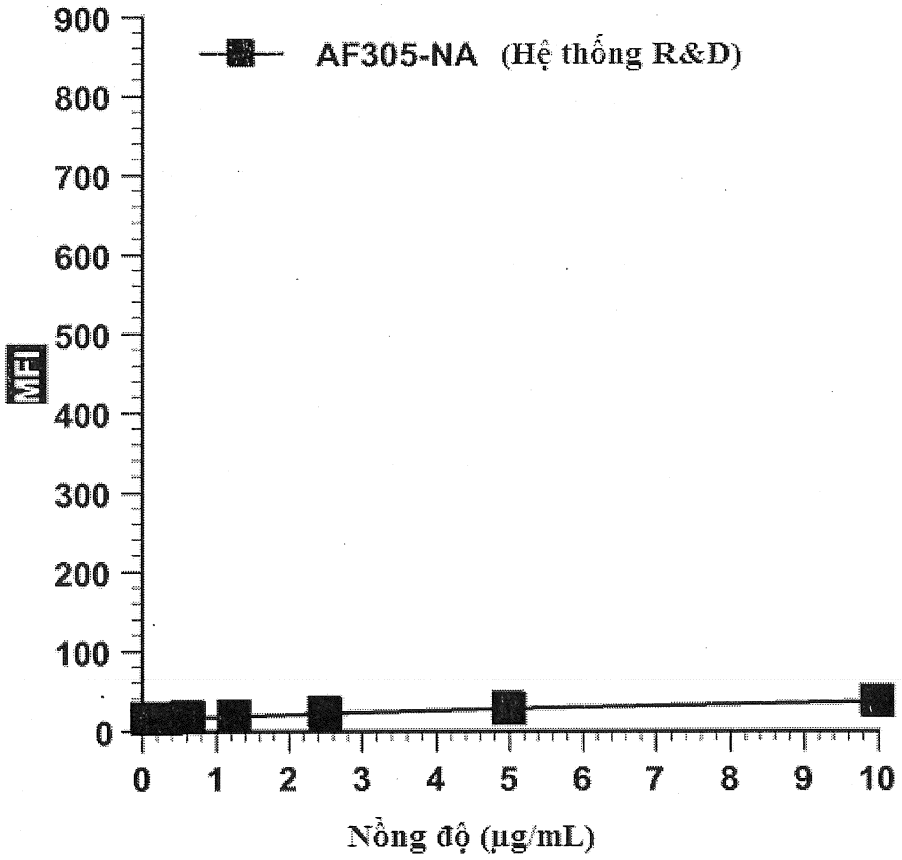
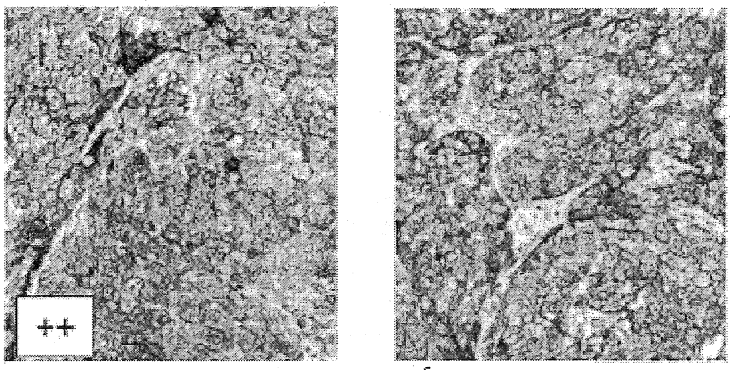
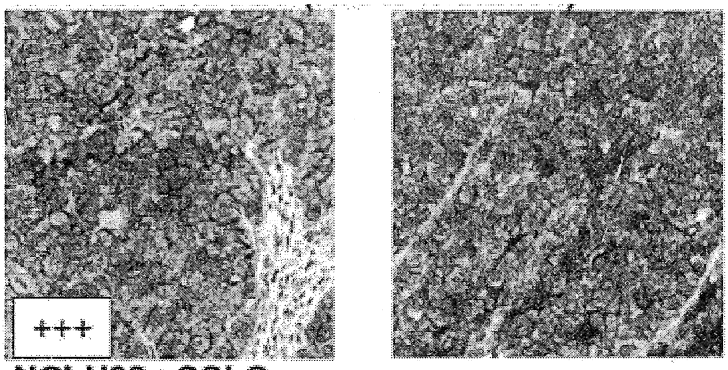


Fig.20D

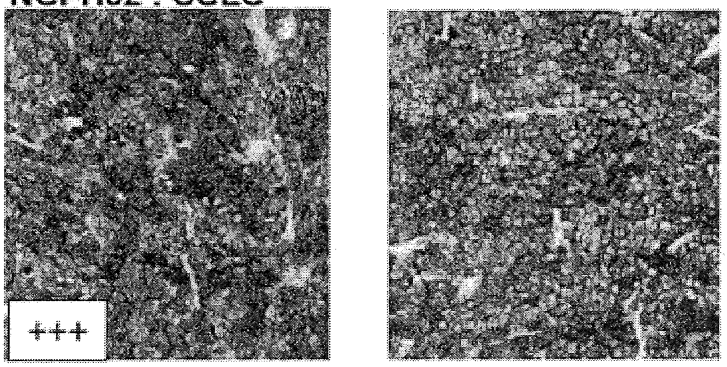
MCF-7 : Bệnh ung thư biểu mô vú



NCI-H23 : NSCLC (đột biến KRAS)



NCI-H82 : SCLC



Hs746t: Bệnh ung thư biểu mô dạ dày

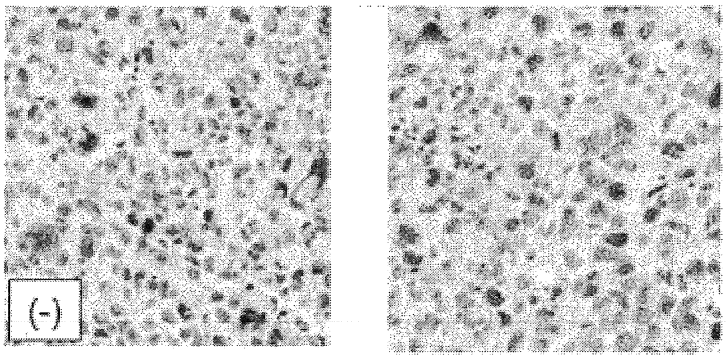


Fig.21

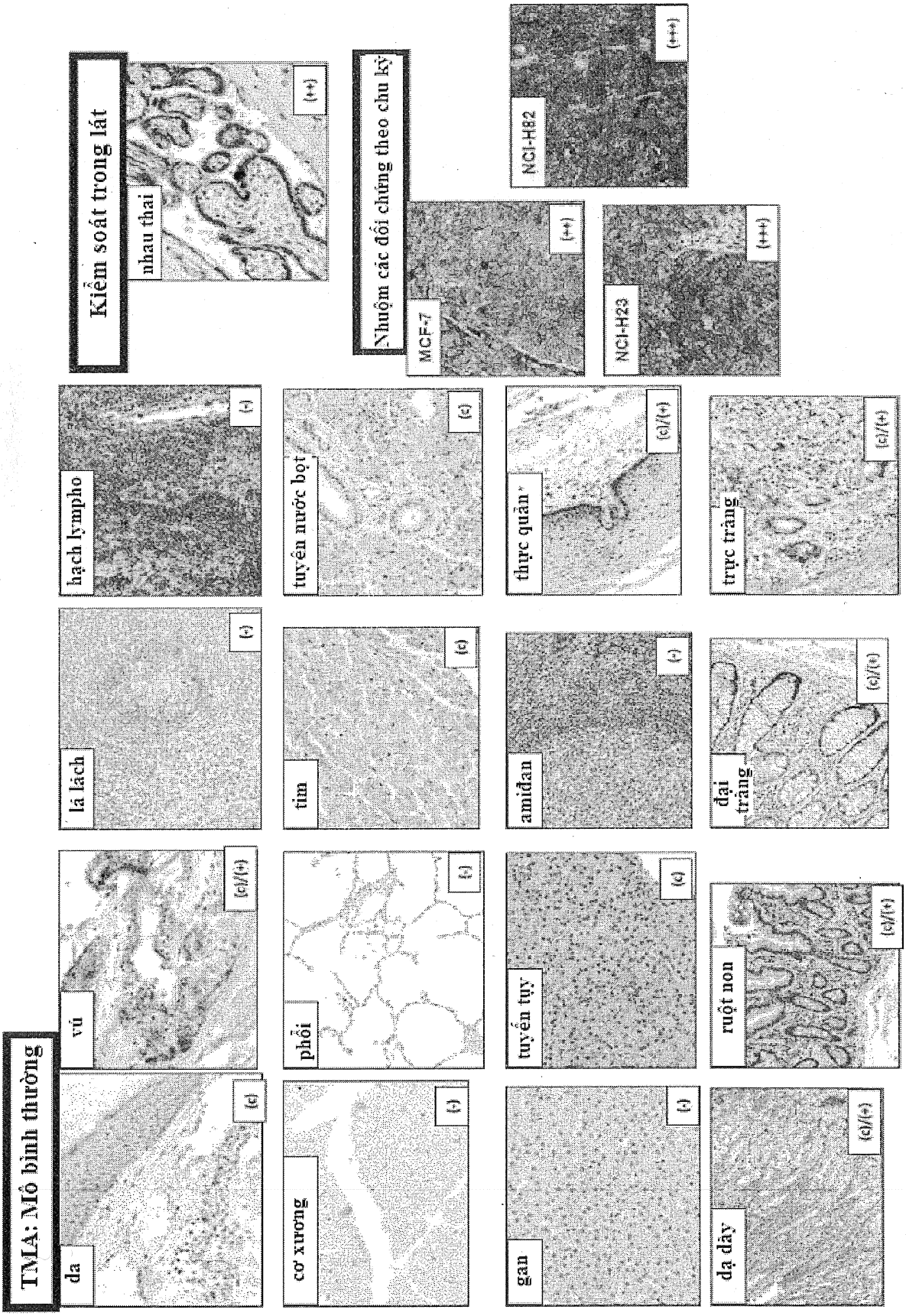

TMA: Mô bình thường
da
(c)
vú
(c)/(+)
cơ xương
(-)
phổi
(-)
gan
(-)
dạ dày
(c)/(+)
lá lách
(-)
hạch lympho
(-)
tim
(c)
tuyến nước bọt
(c)
tuyến tụy
(c)
amiđan
(-)
thực quản
(c)/(+)
ruột non
(c)/(+)
đại tràng
(c)/(+)
trực tràng
(c)/(+)
Kiểm soát trong lát
nhau thai
(++)
Nhuộm các đối chứng theo chu kỳ
MCF-7
(++)
NCI-H23
(+++)
NCI-H82
(+++)

Fig.22A

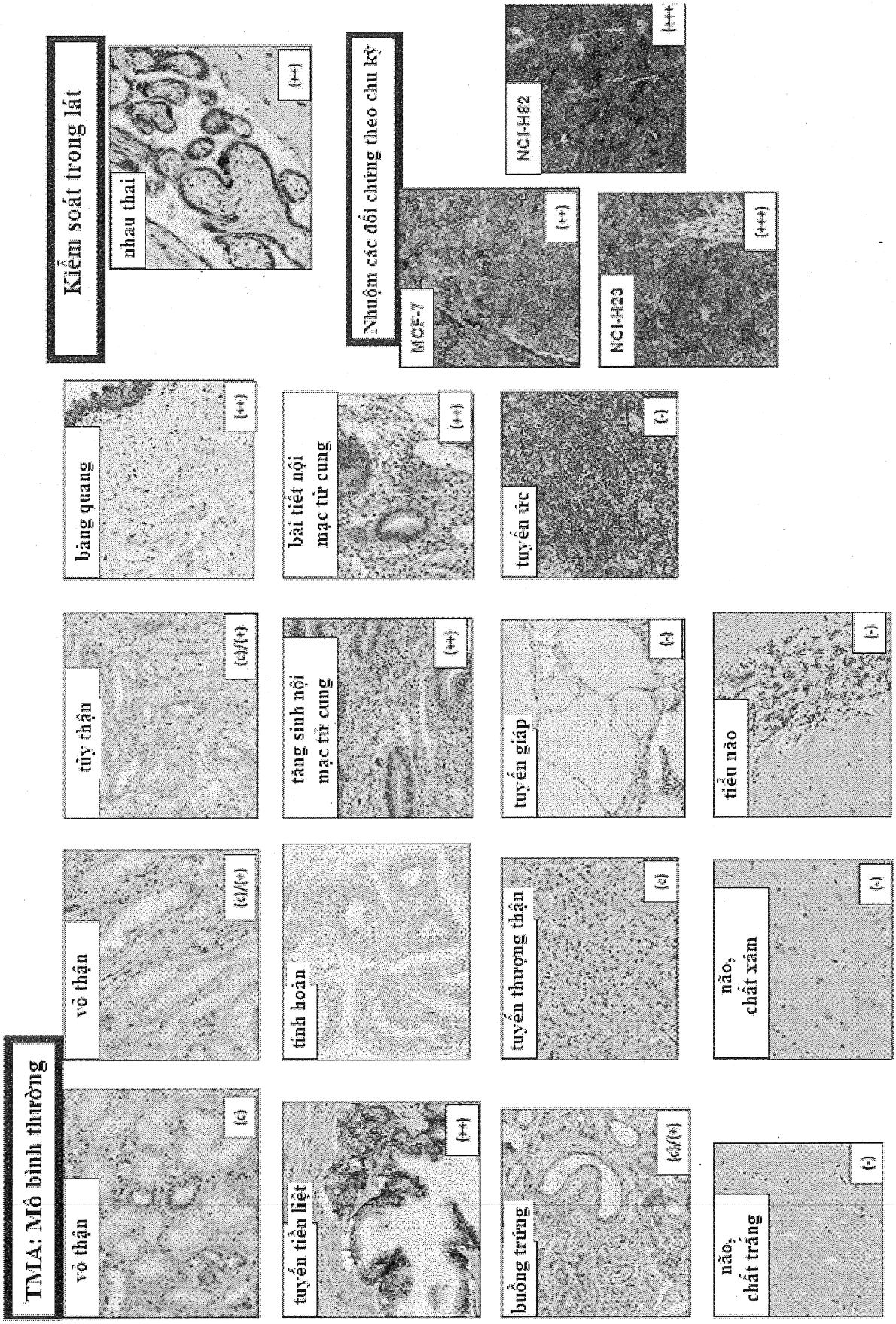

TMA: Mô bình thường
vỏ thận
(-)
vỏ thận
(-)/(+)
tủy thận
(-)/(+)
bàng quang
(++)
Kiểm soát trong lát
nhau thai
(++)
tuyến tiền liệt
(++)
tinh hoàn
tăng sinh nội mạc tử cung
(++)
bài tiết nội mạc tử cung
(++)
Nhuộm các dòng chứng theo chu kỳ
MCF-7
(++)
buồng trứng
(-)/(+)
tuyến thượng thận
(-)
tuyến giáp
(-)
tuyến vú
(-)
NCI-H23
(+++)
NCI-H82
(+++)
não, chất trắng
(-)
não, chất xám
(-)
tiểu não
(-)

Fig.22B

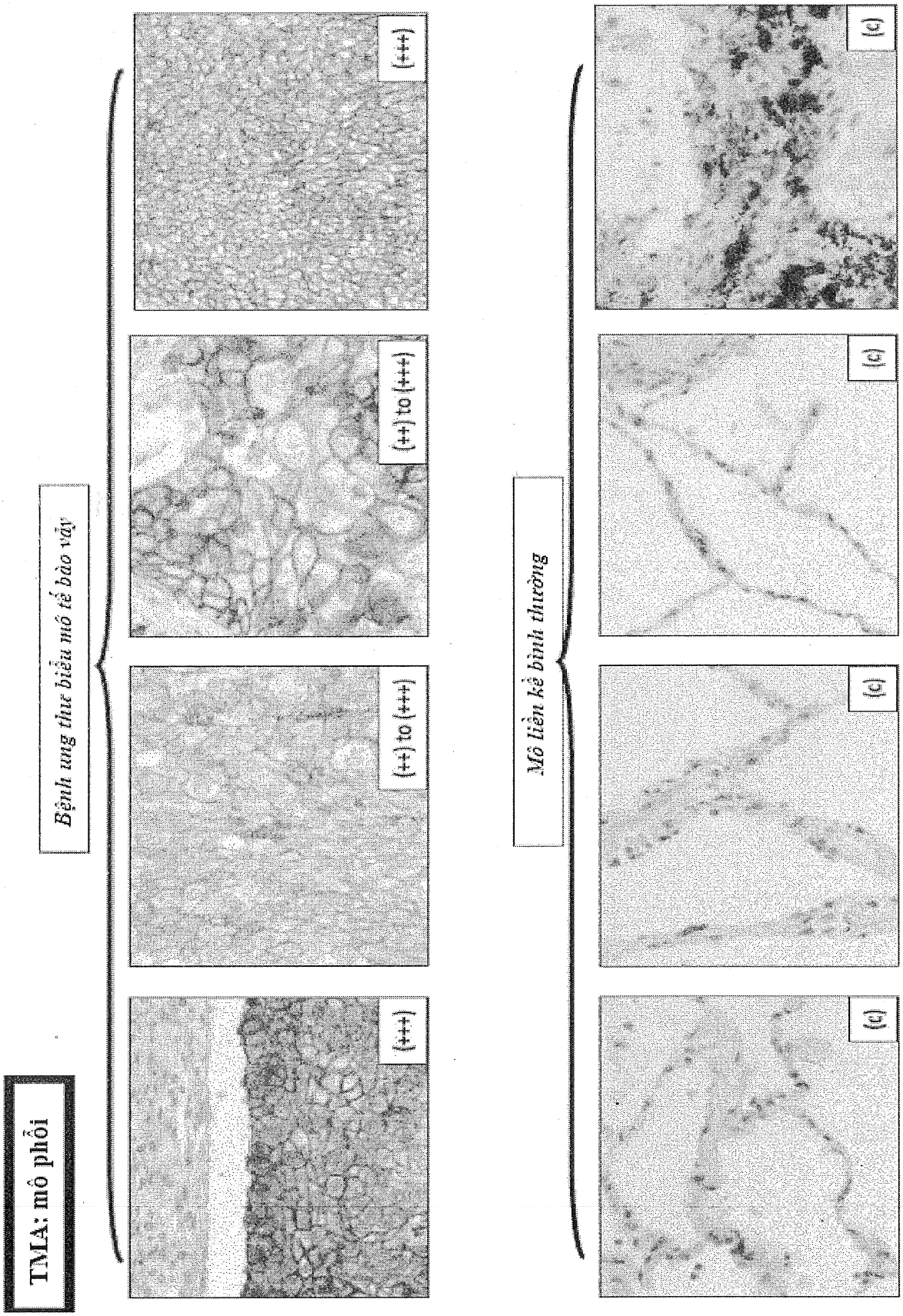

TMA: mô phổi
Bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy
(+++)
(++) to (+++)
(++) to (+++)
Mô liền kề bình thường
(c)
(c)
(c)
(c)

Fig.23

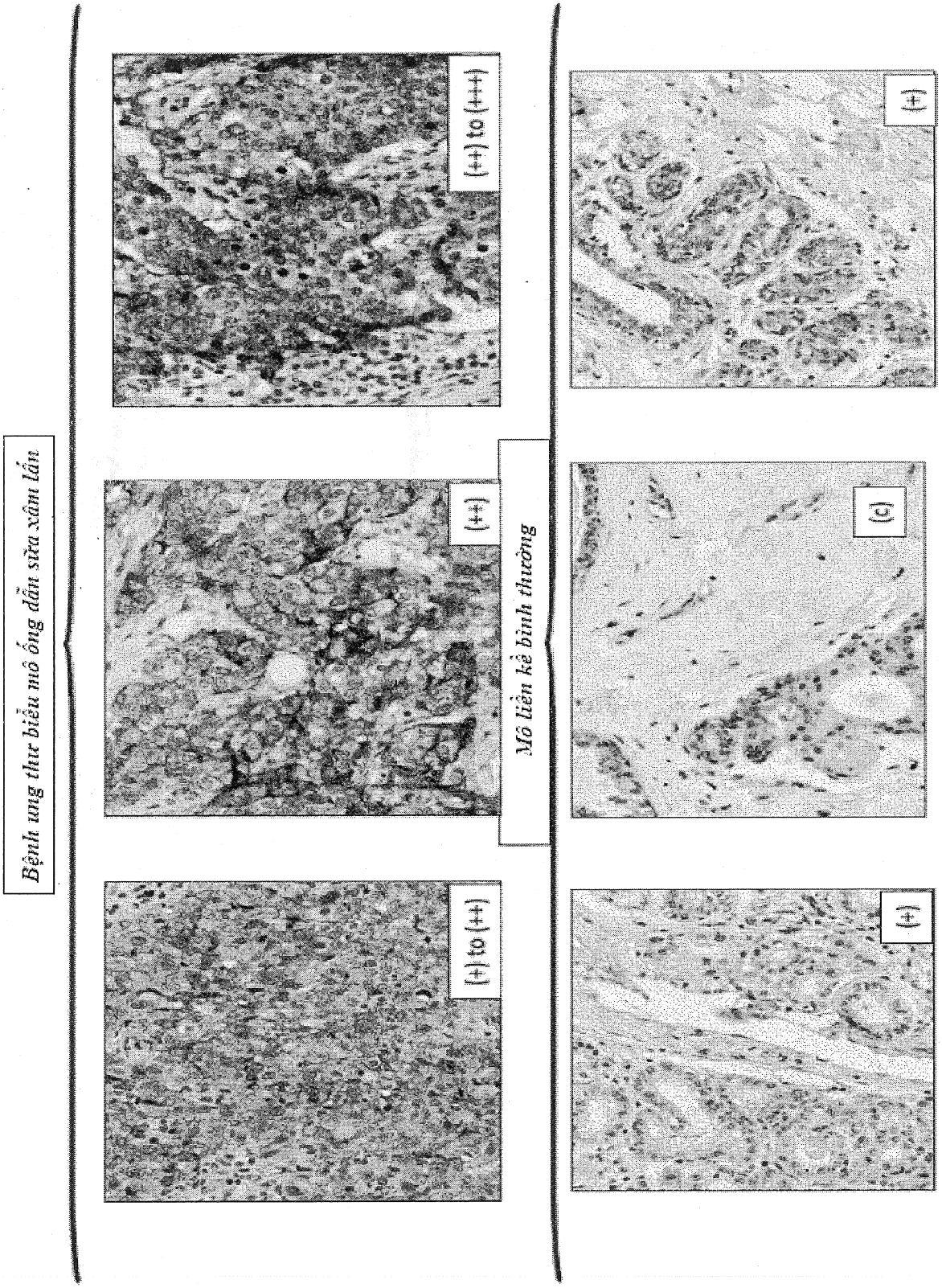

Bệnh ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn
(+) to (++)
(++)
(++) to (+++)
Mô liên kẻ bình thường
(+)
(c)
(+)

Fig.24

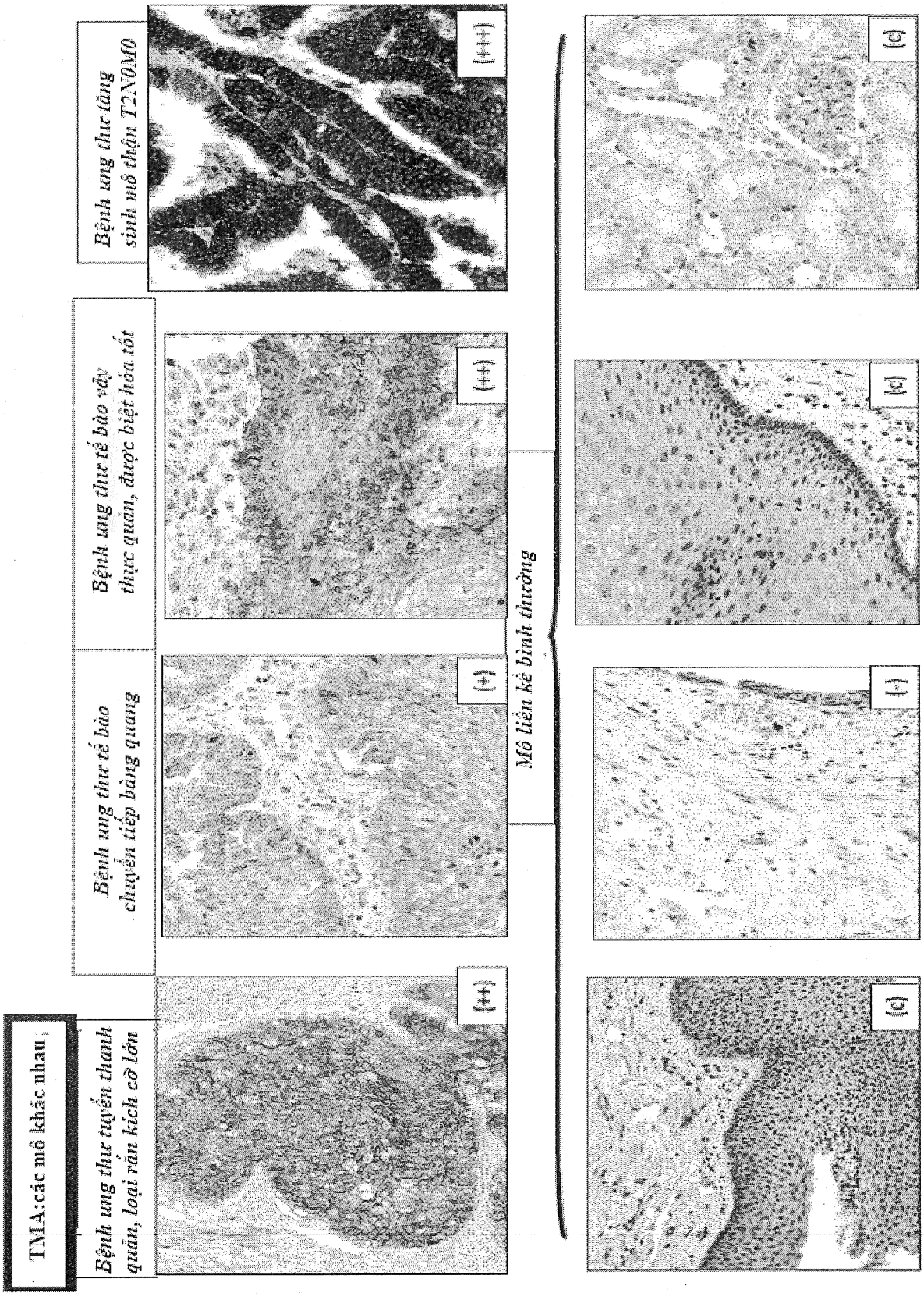

TMA:các mô khác nhau
Bệnh ung thư tuyến thanh quản, loại vảy kích cỡ lớn
(++)
Bệnh ung thư tế bào chuyển tiếp bàng quang
(+)
Bệnh ung thư tế bào vảy thực quản, được biệt hóa tốt
(++)
Bệnh ung thư tăng sinh mô thận T2N0M0
(+++)
Mô liền kề bình thường
(c)
(-)
(c)
(c)

Fig.25

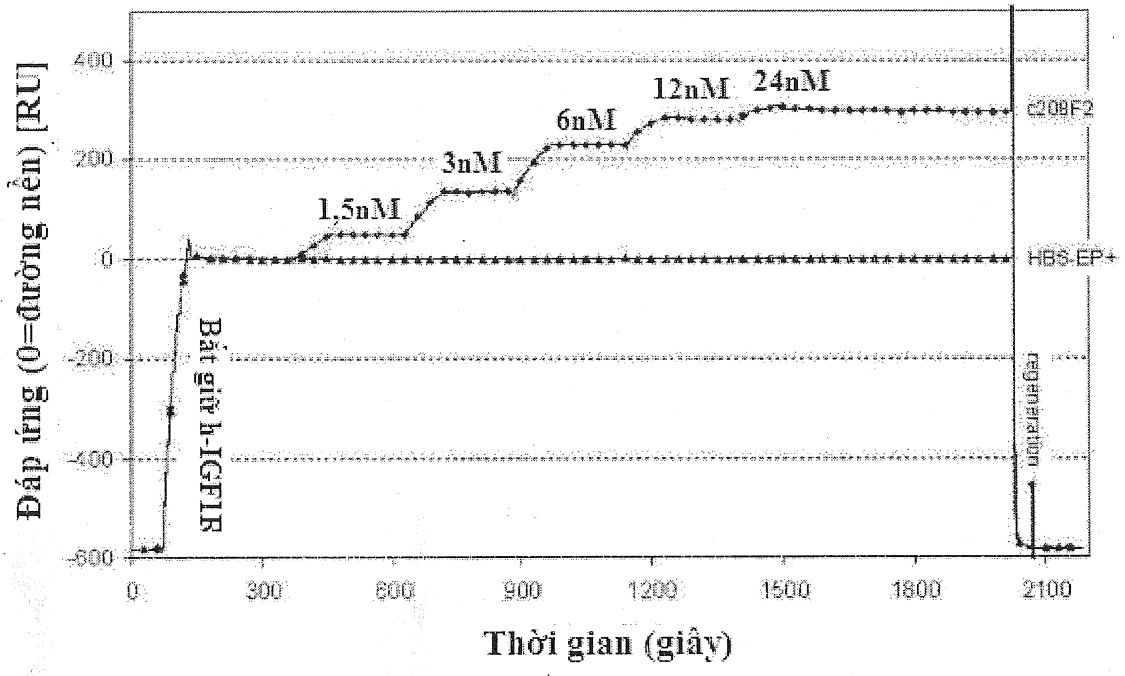

Đáp ứng (0=đường nền) [RU]
400
200
0
-200
-400
-600
0
300
600
900
1200
1500
1800
2100
Thời gian (giây)
1,5nM
3nM
6nM
12nM
24nM
c209F2
HBS-EP+
Bắt giữ h-IGF1R
regeneration

Fig.26

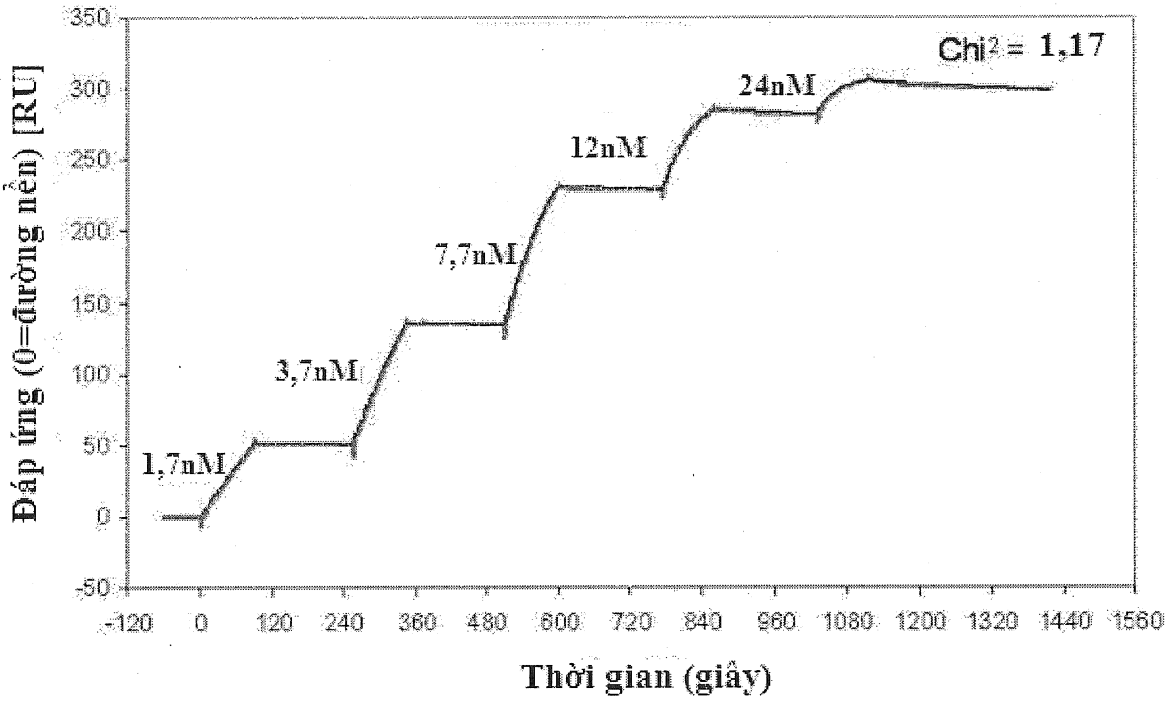

Đáp ứng (0=đường nền) [RU]
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-120
0
120
240
360
480
600
720
840
960
1080
1200
1320
1440
1560
Thời gian (giây)
Chi² = 1,17
1,7nM
3,7nM
7,7nM
12nM
24nM

Fig.27

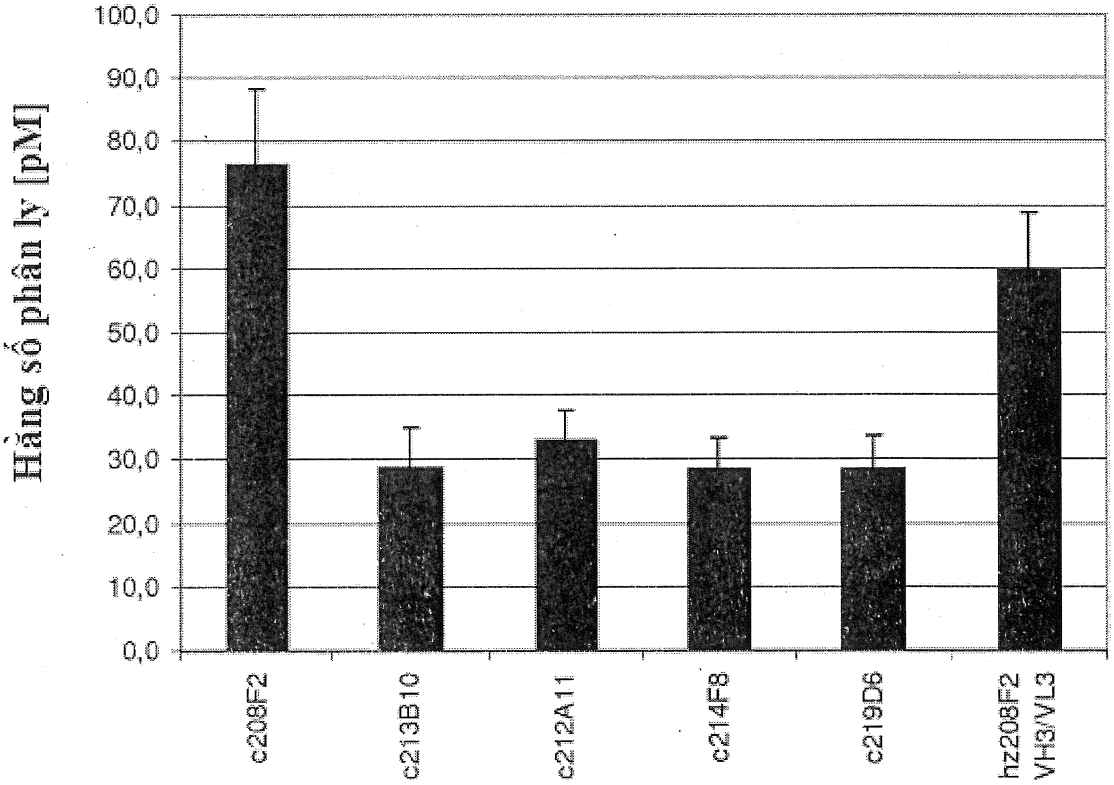

Hằng số phân ly [pM]
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
c208F2
c213B10
c212A11
c214F8
c219D6
hz208F2 VH3/VL3

Fig.28

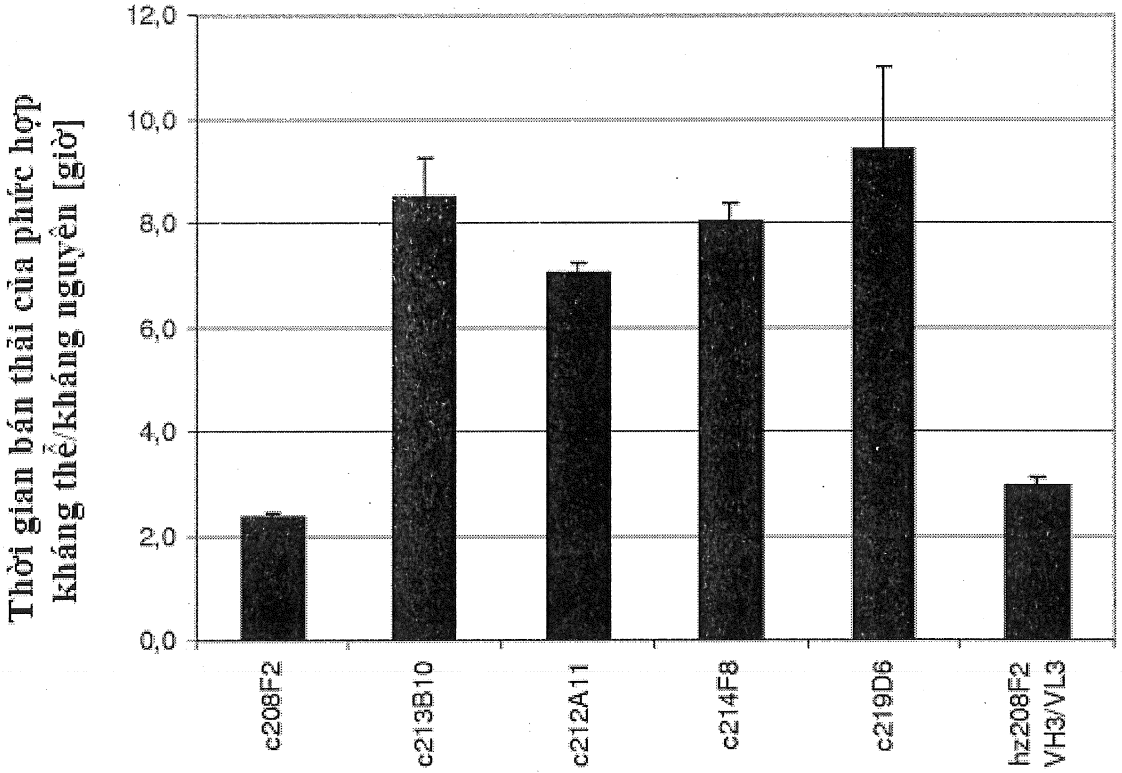

Thời gian bán thải của phức hợp kháng thể/kháng nguyên [giờ]
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
c208F2
c213B10
c212A11
c214F8
c219D6
hz208F2 VH3/VL3

Fig.29

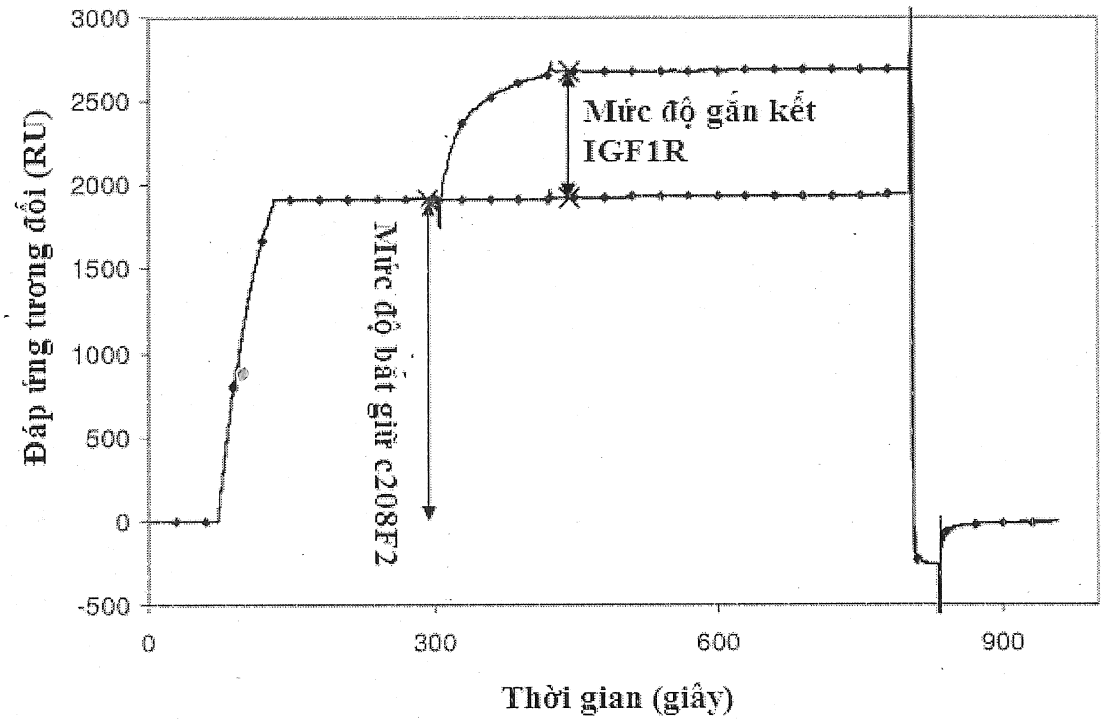

Đáp ứng tương đối (RU)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
0
300
600
900
Thời gian (giây)
Mức độ gắn kết IGF1R
Mức độ bắt giữ c208F2

Fig.30

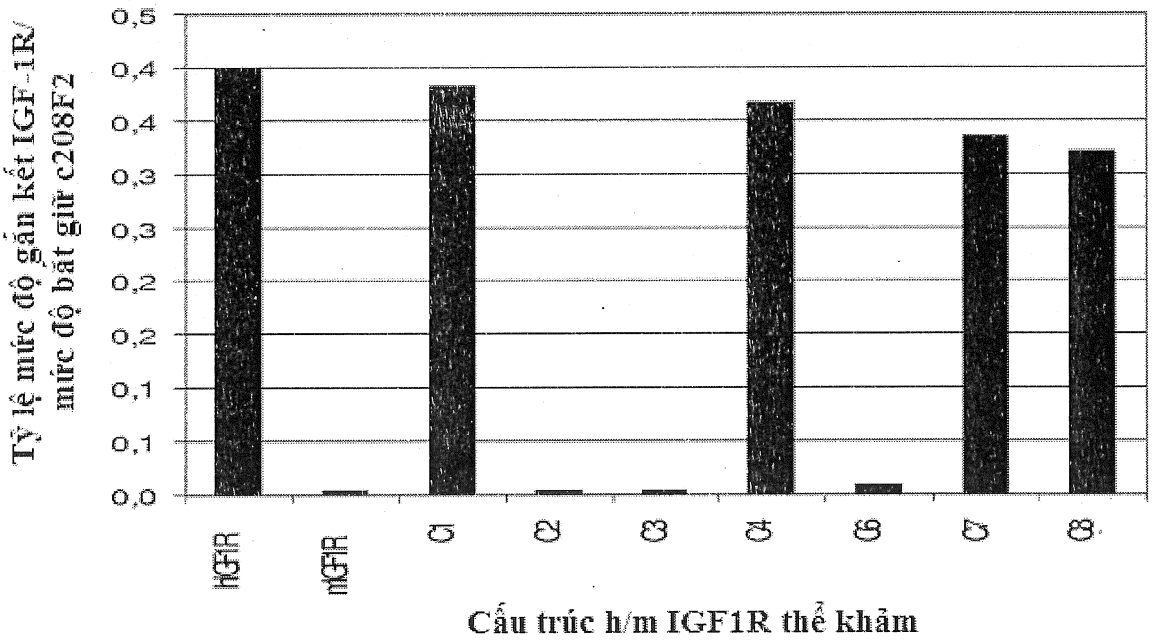

Tỷ lệ mức độ gắn kết IGF-1R/ mức độ bắt giữ c208F2
0,5
0,4
0,4
0,3
0,3
0,2
0,2
0,1
0,1
0,0
hIGFIR
mIGFIR
C1
C2
C3
C4
C6
C7
C8
Cấu trúc h/m IGF1R thể khảm

Fig.31

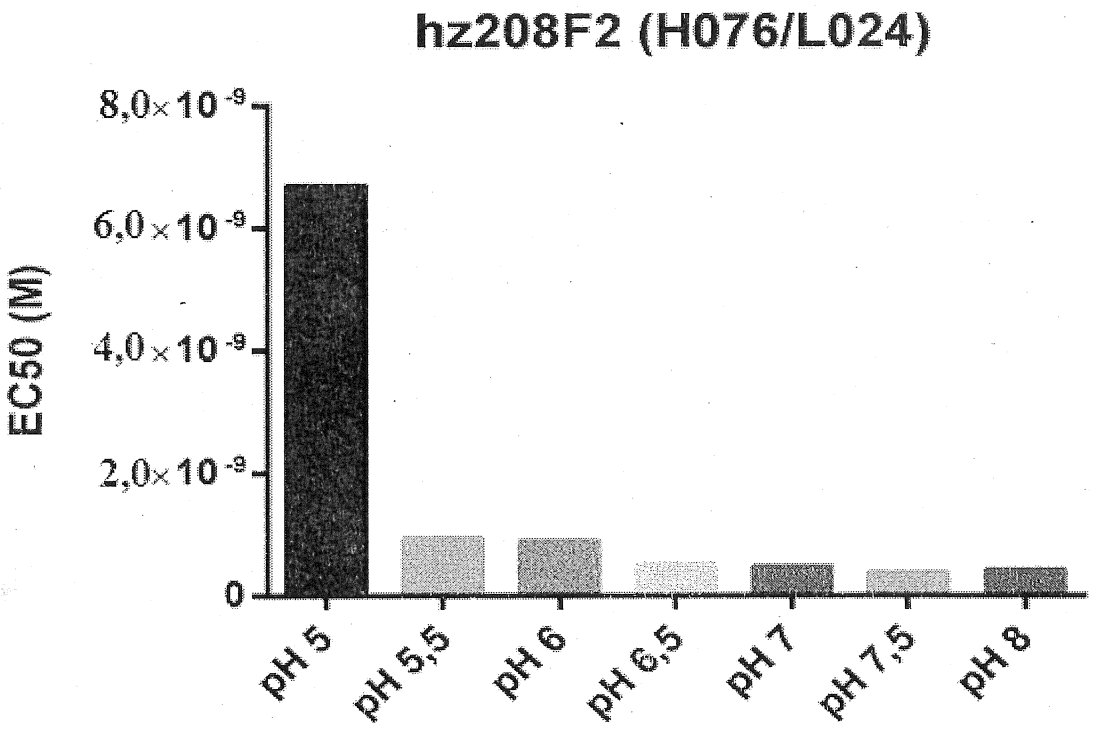


Fig.32A

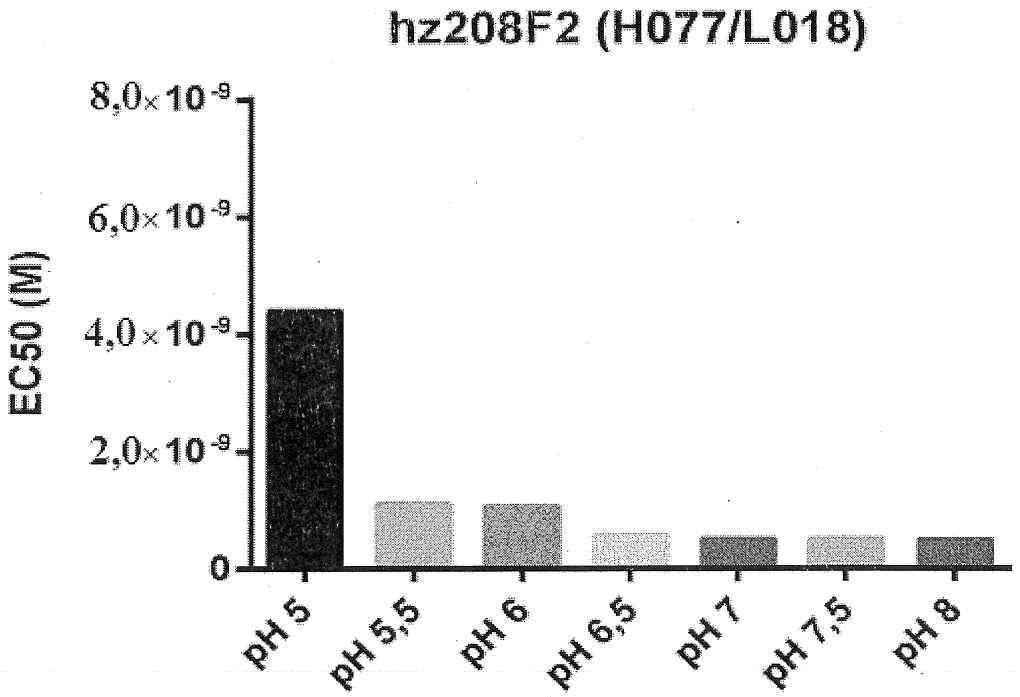


Fig.32B

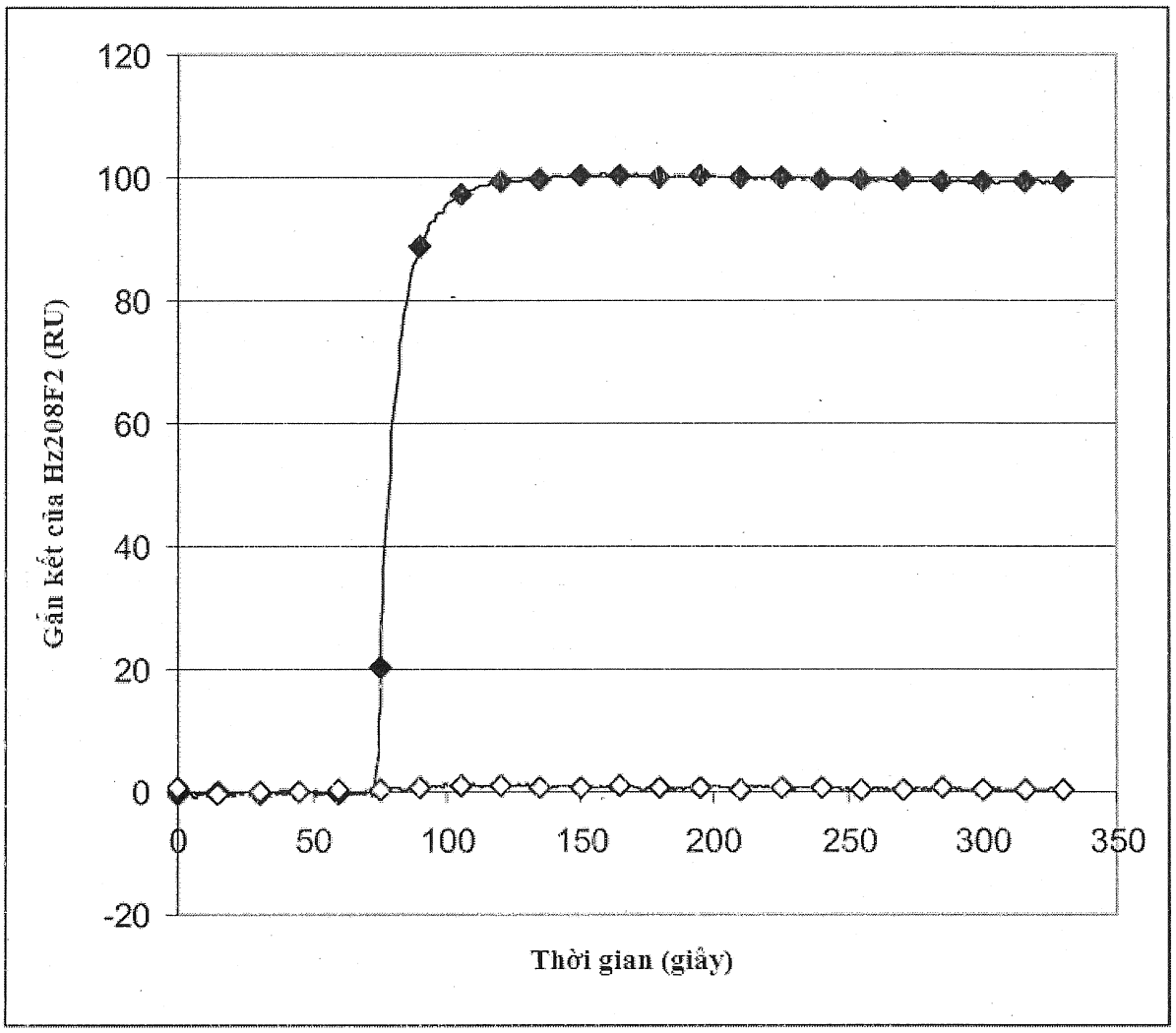

120
100
80
60
40
20
0
-20
0
50
100
150
200
250
300
350
Gắn kết của Hz208F2 (RU)
Thời gian (giây)

Fig.33

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
<120> KHÁNG THỂ NỘI BÀO HÓA, THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT VÀ DƯỢC PHẨM
<130> 367603D33596
<150> US61984160
<151> 2014-04-25
<160> 92
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-H1 liên ứng
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (3)..(3)
<223> Thr có thể được thay thế bằng Ser
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (8)..(8)
<223> Tyr có thể được thay thế bằng Phe
<400> 1
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-H2 liên ứng
<400> 2
Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr
1 5
<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-H3 liên ứng
<400> 3
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CĐR-L1 liên ứng
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (4)..(4)
<223> Ser có thể được thay thế bằng Asn
<400> 4
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
1 5
<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-L2 liên ứng
<400> 5

Tyr Thr Ser
1
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-L3 liên ứng
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (5)..(5)
<223> Thr có thể được thay thế bằng Ala
<400> 6
Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-H1
<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-H1
<400> 8
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Phe
1 5
<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-L1
<400> 9
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
1 5
<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-L1
<400> 10
Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
1 5
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-L3
<400> 11
Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR-L3
<400> 12
Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr Thr
1 5
<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c208F2, chuỗi nặng, VH
<400> 13
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val 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
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c212A11, chuỗi nặng, VH
<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val 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
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c214F8, chuỗi nặng, VH
<400> 15
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c219D6, chuỗi nặng, VH
<400> 16
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c213B10, chuỗi nặng, VH
<400> 17
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val 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
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 18
<211> 107
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c208F2, chuỗi nhẹ, VL
<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c212A11, chuỗi nhẹ, VL
<400> 19
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c214F8, chuỗi nhẹ, VL
<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 21
<211> 107
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c219D6, chuỗi nhẹ, VL
<400> 21
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c213B10, chuỗi nhẹ, VL
<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 23
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c208F2, chuỗi nặng, chiều dài đầy đủ
<400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val 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
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 24
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c212A11, chuỗi nặng, chiều dài đầy đủ
<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val 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
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 25
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c214F8, chuỗi nặng, chiều dài đầy đủ
<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 26
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c219D6, chuỗi nặng, chiều dài đầy đủ
<400> 26
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 27
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c213B10, chuỗi nặng, chiều dài đầy đủ
<400> 27
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val 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
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 28
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c208F2, chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 29
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c212A11, chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 29
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c214F8, chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> c219D6, chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> c213B10, chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 1) chuỗi nặng, VH
<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 3), VH
<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys 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
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 1), VL
<400> 35
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 3), VL
<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 37
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 1), chuỗi nặng, chiều dài đầy đủ
<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 38
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 3), chuỗi nặng chiều dài đầy đủ

<400> 38
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys 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
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 39
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> hz208F2 (biến thể 1), chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 39
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 3), chuỗi nhẹ, chiều dài đầy đủ
<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 2) chuỗi nặng, VH
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (20)..(20)
<223> Met có thể được thay thế bằng Val
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (34)..(34)
<223> Ile có thể được thay thế bằng Met
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (35)..(35)
<223> Tyr có thể được thay thế bằng His
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (38)..(38)
<223> Lys có thể được thay thế bằng Arg
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (48)..(48)
<223> Leu có thể được thay thế bằng Met
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (50)..(50)
<223> Trp có thể được thay thế bằng Ile
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (59)..(59)
<223> Lys có thể được thay thế bằng Ser
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (61)..(61)
<223> Asn có thể được thay thế bằng Ala
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (62)..(62)
<223> Glu có thể được thay thế bằng Gln
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (70)..(70)
<223> Leu có thể được thay thế bằng Met
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (72)..(72)
<223> Ala có thể được thay thế bằng Arg
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (74)..(74)
<223> Lys có thể được thay thế bằng Thr
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (76)..(76)
<223> Ser có thể được thay thế bằng Thr
<220>
<221> Trình tự lỗi

<222> (77)..(77)
<223> Asn có thể được thay thế bằng Ser
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (79)..(79)
<223> Ala có thể được thay thế bằng Val
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (82)..(82)
<223> Phe có thể được thay thế bằng Glu
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (95)..(95)
<223> Phe có thể được thay thế bằng Tyr
<400> 41
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys 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
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 (biến thể 2), chuỗi nhẹ, VL
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (22)..(22)
<223> Ser có thể được thay thế bằng Thr
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (53)..(53)
<223> Arg có thể được thay thế bằng Ser
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (55)..(55)
<223> His có thể được thay thế bằng Gln
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (65)..(65)
<223> Arg có thể được thay thế bằng Ser
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (71)..(71)
<223> Tyr có thể được thay thế bằng Phe
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (72)..(72)
<223> Ser có thể được thay thế bằng Thr
<220>
<221> Trình tự lỗi

<222> (77)..(77)
<223> Asn có thể được thay thế bằng Ser
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (87)..(87)
<223> Phe có thể được thay thế bằng Tyr
<400> 42
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 43
<211> 329
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền hằng định (VH) IgG1
<400> 43
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 44
<211> 326
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Miền hằng định (VH) IgG4 (S228P)
<400> 44
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền kapa (VL)
<400> 45
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
<210> 46
<211> 98
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng mầm của người IGHV1-46*01
<400> 46
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg
<210> 47
<211> 95
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng mầm của người IGKV1-39*01
<400> 47
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
85 90 95
<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng mầm của người IGHJ4*01
<400> 48

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15
<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng mầm của người IGKJ4*01
<400> 49
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 50
<211> 1367
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> IGF-1R (người)
<400> 50
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn

355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met

850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925
Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
930 935 940
Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945 950 955 960
Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
965 970 975
Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
980 985 990
Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
995 1000 1005
Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
1010 1015 1020
Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
1025 1030 1035
Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
1040 1045 1050
Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
1055 1060 1065
Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
1070 1075 1080
Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
1085 1090 1095
Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
1100 1105 1110
Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
1115 1120 1125
Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
1130 1135 1140
Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg
1145 1150 1155
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu
1160 1165 1170
Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val
1175 1180 1185
Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp
1190 1195 1200
Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn
1205 1210 1215
Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
1220 1225 1230
Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
1235 1240 1245
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
1250 1255 1260
Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser
1265 1270 1275
Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu
1280 1285 1290
Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
1295 1300 1305
Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
1310 1315 1320
Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
1325 1330 1335

Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
1340 1345 1350
Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
1355 1360 1365
<210> 51
<211> 932
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> IGF-1R ECD (người)
<400> 51
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr

915 920 925
Gly Tyr Glu Asn
930
<210> 52
<211> 512
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu tận cùng N IGF-1R ECD (người)
<400> 52
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp

420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> tetrapeptit (gốc liên kết)
<400> 53
Gly Phe Leu Gly
1
<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> tetrapeptit (gốc liên kết)
<400> 54
Ala Leu Ala Leu
1
<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> tetrapeptit (gốc liên kết)
<400> 55
Pro Val Gly Val Val
1 5
<210> 56
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H037, VH
<400> 56
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 57
<211> 107

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L018, VL
<400> 57
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 58
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H037 chiều dài đầy đủ
<400> 58
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 59
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L018 chiều dài đầy đủ
<400> 59
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L021, VL
<400> 60

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

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L021 chiều dài đầy đủ
<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 62
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H047, VH
<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 63
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H047 chiều dài đầy đủ
<400> 63
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 64
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H049, VH
<400> 64
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 65
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H049 chiều dài đầy đủ
<400> 65
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

<210> 66
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H051, VH
<400> 66
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H051 chiều dài đầy đủ
<400> 67
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 68
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H052, VH
<400> 68
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 69
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H052 chiều dài đầy đủ
<400> 69
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 70
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H057, VH
<400> 70
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 71
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H057 chiều dài đầy đủ
<400> 71
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 72
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H068, VH
<400> 72
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 73
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H068 chiều dài đầy đủ
<400> 73
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 74
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H070, VH
<400> 74
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 75
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H070 chiều dài đầy đủ
<400> 75
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 76
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H071, VH
<400> 76
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 77
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H071 chiều dài đầy đủ
<400> 77
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 78
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H076, VH
<400> 78
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 79
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H076 chiều dài đầy đủ
<400> 79
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 80
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H077, VH
<400> 80
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 81
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H077 chiều dài đầy đủ
<400> 81
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly
<210> 82
<211> 512
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu tận cùng N IGF-1R ECD được đột biến với arginin ở vị trí số 494
<400> 82
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu

130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510

<210> 83
<211> 941
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C1 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 83
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val

65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560
Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Arg Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys Thr
915 920 925
Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His
930 935 940

<210> 84
<211> 939
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C2 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 84
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225 230 235 240
Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
325 330 335
Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
340 345 350
Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
355 360 365
Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
370 375 380
Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385 390 395 400
Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
405 410 415
Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
420 425 430
Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
435 440 445
Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
450 455 460
Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465 470 475 480
Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe
485 490 495
Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
500 505 510
Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
515 520 525
Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
530 535 540
Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545 550 555 560
Lys Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
565 570 575
Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn

580 585 590
Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
595 600 605
Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
610 615 620
Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly
625 630 635 640
Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
645 650 655
Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
660 665 670
Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
675 680 685
Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
690 695 700
Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705 710 715 720
Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
725 730 735
Glu Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
740 745 750
Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
755 760 765
Pro Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
770 775 780
Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785 790 795 800
Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
805 810 815
Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
820 825 830
Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
835 840 845
Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
850 855 860
Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865 870 875 880
Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
885 890 895
Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
900 905 910
Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys
915 920 925
Thr Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
930 935

<210> 85
<211> 938
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C3 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 85
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu

85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925
Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
930 935
<210> 86
<211> 938
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C4 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 86
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu

```
                85                  90                  95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495
Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
        515                 520                 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
    530                 535                 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545                 550                 555                 560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
                565                 570                 575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
            580                 585                 590
```

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925
Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
930 935

<210> 87
<211> 938
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C6 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 87
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala

595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925
Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
930 935

<210> 88
<211> 939
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C7 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 88
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe

```
                100                 105                 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
            115                 120                 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
        130                 135                 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225                 230                 235                 240
Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255
Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
        275                 280                 285
Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
    290                 295                 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
                325                 330                 335
Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
            340                 345                 350
Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
        355                 360                 365
Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
    370                 375                 380
Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385                 390                 395                 400
Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
                405                 410                 415
Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
            420                 425                 430
Trp Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr
        435                 440                 445
Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
    450                 455                 460
Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465                 470                 475                 480
Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe
                485                 490                 495
Thr Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
            500                 505                 510
Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
        515                 520                 525
Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
    530                 535                 540
Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560
Lys Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
                565                 570                 575
Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
            580                 585                 590
Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
        595                 600                 605
```

Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
610 615 620
Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly
625 630 635 640
Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
645 650 655
Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
660 665 670
Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
675 680 685
Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
690 695 700
Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705 710 715 720
Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
725 730 735
Glu Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
740 745 750
Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
755 760 765
Pro Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
770 775 780
Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785 790 795 800
Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
805 810 815
Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
820 825 830
Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
835 840 845
Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
850 855 860
Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865 870 875 880
Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
885 890 895
Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
900 905 910
Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys
915 920 925
Thr Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
930 935

<210> 89
<211> 938
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C8 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 89
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430
Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser

610 615 620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925
Gly Tyr Glu Asn His His His His His His
930 935

<210> 90
<211> 942
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mảnh C9 chứa trình tự đánh dấu His
<400> 90
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile

```
        115                 120                 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225                 230                 235                 240
Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255
Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
        275                 280                 285
Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
    290                 295                 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
                325                 330                 335
Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
            340                 345                 350
Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
        355                 360                 365
Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
    370                 375                 380
Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385                 390                 395                 400
Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
                405                 410                 415
Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
            420                 425                 430
Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
        435                 440                 445
Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
    450                 455                 460
Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465                 470                 475                 480
Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe
                485                 490                 495
Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
            500                 505                 510
Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
        515                 520                 525
Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
    530                 535                 540
Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560
Lys Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
                565                 570                 575
Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
            580                 585                 590
Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
        595                 600                 605
Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
```

610 615 620
Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly
625 630 635 640
Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
645 650 655
Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
660 665 670
Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
675 680 685
Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
690 695 700
Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705 710 715 720
Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
725 730 735
Glu Arg Arg Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
740 745 750
Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
755 760 765
Pro Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
770 775 780
Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785 790 795 800
Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
805 810 815
Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
820 825 830
Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
835 840 845
Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
850 855 860

Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865 870 875 880

Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
885 890 895
Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
900 905 910
Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys
915 920 925
Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His
930 935 940
<210> 91
<211> 942
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> IGF-1R (chuột), miền ngoại bào chứa trình tự đánh dấu His

<400> 91
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225 230 235 240
Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
275 280 285
Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
290 295 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
325 330 335
Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
340 345 350
Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
355 360 365
Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
370 375 380
Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385 390 395 400
Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
405 410 415
Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
420 425 430
Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
435 440 445
Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
450 455 460
Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465 470 475 480
Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe
485 490 495
Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
500 505 510
Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
515 520 525
Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
530 535 540
Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545 550 555 560
Lys Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
565 570 575
Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn

580 585 590
Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
595 600 605
Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
610 615 620
Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly
625 630 635 640
Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
645 650 655
Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
660 665 670
Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
675 680 685
Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
690 695 700
Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705 710 715 720
Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
725 730 735
Glu Arg Arg Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
740 745 750
Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
755 760 765
Pro Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
770 775 780
Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785 790 795 800
Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
805 810 815
Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
820 825 830
Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
835 840 845
Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
850 855 860
Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865 870 875 880
Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
885 890 895
Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
900 905 910
Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys
915 920 925
Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His
930 935 940
<210> 92
<211> 512
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu tận cùng N IGF-1R ECD được đột biến với alanin ở vị trí số 491
<400> 92
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15
Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu

```
                85                  90                  95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
            100                 105                 110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
        115                 120                 125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
    130                 135                 140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145                 150                 155                 160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
                165                 170                 175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
            180                 185                 190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
        195                 200                 205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
    210                 215                 220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225                 230                 235                 240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
                245                 250                 255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
            260                 265                 270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
        275                 280                 285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
    290                 295                 300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305                 310                 315                 320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
                325                 330                 335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
            340                 345                 350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
        355                 360                 365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
    370                 375                 380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
                405                 410                 415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
            420                 425                 430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
        435                 440                 445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
    450                 455                 460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465                 470                 475                 480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Ala Val Leu His Phe Thr
                485                 490                 495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
            500                 505                 510
```