



(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)



1-0031930

(51)⁷ C07K 16/30; A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2018-01679

(22) 23/09/2016

(86) PCT/KR2016/010604 23/09/2016

(87) WO 2017/052241 A1 30/03/2017

(30) 10-2015-0135755 24/09/2015 KR

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/08/2018 365A

(73) 1. MOGAM INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH (KR)

93, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 16924, Republic of Korea

2. GREEN CROSS CORPORATION (KR)

107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 16924, Republic of Korea

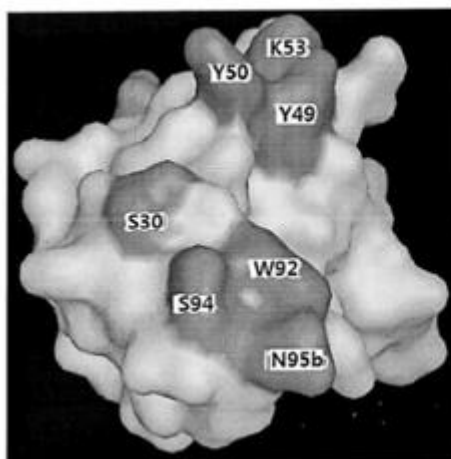
(72) KIM, Dong-Sik (KR); SONG, Eun Jung (KR); LEE, Mijung (KR); LEE, Eun-Hee (KR); OH, Miyoung (KR); PARK, Jae Chan (KR); KIM, Kisu (KR); KIM, Sujeong (KR); LIM, Hyung-Kwon (KR); LEE, Kyuhyun (KR); WON, Jongwha (KR); CHOI, Soongyu (KR); PARK, Young Seoub (KR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

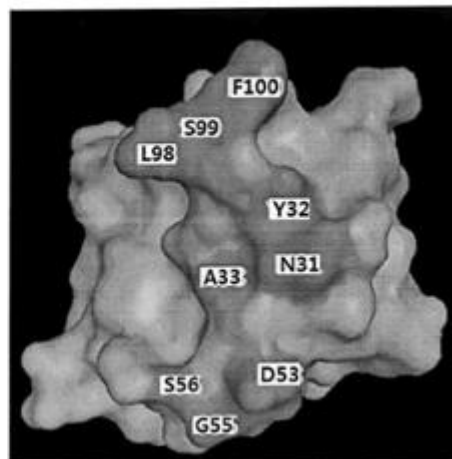
(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI MESOTHELIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin (MSLN), axit nucleic mã hóa kháng thể này, vectơ và tế bào chủ chứa axit nucleic, phương pháp sản xuất kháng thể. Kháng thể này liên kết đặc hiệu với mesothelin theo sáng chế có ái lực cao và tính đặc hiệu với kháng nguyên, do đó có thể phát triển kháng thể này một cách hiệu quả để có thể sử dụng trong điều trị hoặc chẩn đoán bệnh ung thư hoặc bệnh khối u.

VL



VH



Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin (MSLN), axit nucleic mã hóa kháng thể này, vector và tế bào chủ chứa axit nucleic, phương pháp sản xuất kháng thể, và được phẩm điều trị bệnh ung thư hoặc khối u chứa kháng thể làm thành phần hoạt tính.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng thể có hiệu quả cao trong điều trị nhiều bệnh ung thư và khối u khác nhau bao gồm các khối u rắn. Ví dụ, Herceptin đã được sử dụng thành công trong điều trị bệnh ung thư vú, và Avastin đã được sử dụng thành công trong điều trị bệnh ung thư ruột kết. Cốt lõi của việc phát triển các phương pháp điều trị bệnh ung thư hoặc khối u bằng kháng thể là phát triển kháng thể chống lại protein bề mặt màng được biểu hiện vượt trội (biểu hiện quá mức) ở các tế bào khối u.

Mesothelin (MSLN) là glycoprotein dưới dạng polypeptit tiền chất có kích thước 69 đến 71kDa, và được biểu hiện dưới dạng tiền chất của protein liên kết với glycophosphatidylinositol (GPI) trên bề mặt tế bào. Phân tử tiền chất này được tách ra từ vị trí furin (RPRFRR) trong tiền chất, và tạo ra yếu tố kích thích tế bào nhân khổng lồ kích thước 32kDa (megakaryocyte potentiating factor - MPF) là polypeptit đầu tận cùng N được giải phóng từ tế bào với protein màng mesothelin liên kết với GPI là polypeptit đầu tận cùng C kích thước 40kDa (Hassan R. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937-3942, 2004; Chang, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(1):136-40, 1996).

Mesothelin được gọi là yếu tố kích thích tế bào nhân khổng lồ (MPF) bởi vì nó đã được tinh sạch từ dòng tế bào tủy người HPC-Y5, và được thấy là có hoạt tính kích thích tế bào nhân khổng lồ (Yamaguchi N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:805-808, 1994).

Chức năng của mesothelin vẫn còn chưa được biết đến một cách rõ ràng. Hơn

nữa, chưa quan sát thấy bất thường về sinh sản, huyết học hoặc giải phẫu gây chết khi tạo ra chuột thiếu hụt biểu hiện gen mesothelin (Bera, T.K. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 20(8):2902-2906, 2000).

Mesothelin là glycoprotein có mặt trên bề mặt tế bào của lớp lót trung biểu mô của khoang màng bụng, màng phổi và màng ngoài tim. Mesothelin được biểu hiện vượt trội (biểu hiện quá mức) ở khối u trung biểu mô là tế bào ung thư/khối u, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư dạ dày, ung thư phổi và ung thư nội mạc tử cung. Ngược lại, sự biểu hiện của mesothelin bị giới hạn ở tế bào bình thường, ví dụ, tế bào trung biểu mô, có thể là đích lý tưởng của phương pháp điều trị khối u (Argani, P. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 7(12):3862-8, 2001; Hassan, R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937, 2004).

Hơn nữa, mesothelin phản ứng (tương tác) đặc hiệu với CA125 (MUC-16) là glycoprotein giống mucin có mặt trên bề mặt tế bào khối u được xác định là kháng nguyên của ung thư buồng trứng. Cụ thể là, dường như liên kết của CA125 với mesothelin liên kết màng tế bào có thể làm trung gian cho sự bám dính và di căn của tế bào khác loại, và CA125 và mesothelin được biểu hiện đồng thời ở ung thư tuyến buồng trứng tiến triển (Rump, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279(10):9190-8, 2004). Sự biểu hiện của mesothelin ở màng trong của khoang màng bụng có tương quan với phần ưa thích để tạo ra sự di căn của ung thư buồng trứng, và liên kết mesothelin-CA125 tạo thuận lợi cho sự di căn trong màng bụng của khối u buồng trứng (Gubbels, J.A. *et al.*, *Mol. Cancer*, 5(1):50, 2006).

Trong những năm gần đây, phép điều trị hướng đích dựa trên kháng thể hướng mục tiêu đến bệnh ung thư phổi, ung thư buồng trứng, và ung thư tụy có biểu hiện mesothelin đã được phát triển. Ví dụ, mAb K1 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho chuột đã được phát triển làm kháng thể sơ cấp kháng polypeptit mesothelin liên kết màng (Chang, K., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 50(3):373, 1992). Tuy nhiên, do ái lực thấp của kháng thể mAb K1 và tốc độ nội hóa kém, độc tố miễn dịch chứa mAb K1 được

liên kết với dạng cắt cụt của ngoại độc tố A của *Pseudomonas* được biến tính hóa học không phù hợp để phát triển lâm sàng (Hassan, R., *et al.*, *J. Immunother.*, 23(4):473, 2000; Hassan, R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937, 2004). Sau đó, các kháng thể chuỗi đơn có ái lực cao hơn gồm SS1-(dsFv)-PE38 đã được phát triển, có khả năng tiêu diệt tế bào khối u in vitro (Hassan, R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 8(11):3520, 2002), và có hiệu quả ở mô hình khối u biểu hiện mesothelin của người ở loài gặm nhấm (Fan, D., *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 1(8):595, 2002). Có thể hiểu được từ các kết quả nêu trên rằng mesothelin là đích phù hợp cho các liệu pháp miễn dịch điều trị nhiều bệnh ung thư. Tuy nhiên, quan sát được rằng SS1-(dsFv)-PE38 có tính sinh miễn dịch trong các thử nghiệm lâm sàng, nên phải dừng việc sử dụng chúng lần hai ở hầu hết người bệnh, và SS1-(dsFv)-PE38 có xu hướng bị loại bỏ nhanh chóng ra khỏi máu và do đó, có nỗ lực để gây ra sự pegyl hóa SS1-(dsFv)-PE38 thành dạng protein dung hợp, nhờ đó làm tăng độ bền của kháng thể in vivo (Filpula, D., *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 18(3):773, 2007).

US 2014/004121 A1 bộc lộ kháng thể của người kháng mesothelin phân lập được hoặc protein liên kết kháng nguyên hoặc đoạn của chúng, trong đó kháng thể này có ít nhất một tổng các đặc tính sau: a. liên kết với epitope kkhacsvowis kháng thể MORAb-009; b. cạnh tranh để liên kết với Ab237; c. liên kết đặc hiệu với mesothelin của người, khỉ cyno, chuột to và chuột nhắt; d. không nội hóa khi liên kết với mesothelin; e. khi liên kết với mesothelin, không ức chế sự tương tác CA125 với mesothelin; f. có ái lực liên kết KD ít nhất là 5,0 pM đối với mesothelin của người; g. có chức năng làm chất tác động tăng cường; h. ưu tiên liên kết với mesothelin liên kết màng hơn so với mesothelin hòa tan; và i. làm giảm sự phát triển của các tế bào khối u biểu hiện mesothelin in vivo.

Thử nghiệm lâm sàng của liệu pháp điều trị ung thư bằng độc tố miễn dịch có mô hình động vật gặm nhấm ghép ngoại lai làm mô hình bệnh ung thư thường bị hạn chế ở chỗ thiếu tính phản ứng chéo giữa kháng thể điều trị và dạng tương đồng của nó

từ loại gặm nhấm. Ngoài ra, sự trung hòa kháng thể Fv kháng chuột được tạo ra từ người bệnh được xử lý bằng kháng thể có nguồn gốc từ loài gặm nhấm hoặc kháng thể thể khảm có thể gây ra tính độc giới hạn liều hoặc có thể làm giảm hiệu quả điều trị bệnh. Do đó, để làm tăng hiệu quả điều trị bệnh ung thư, cần có kháng thể đích được kết hợp với ái lực tăng, tốc độ phân ly giảm, và tính phản ứng chéo của loài gặm nhấm với kháng nguyên mesothelin.

Ngoài ra, vốn là đặc tính bổ sung của kháng thể kháng mesothelin (MSLN) mới, nó cần duy trì ái lực với mesothelin được biểu hiện trên bề mặt tế bào của các tế bào ung thư hoặc khối u khác nhau. Mesothelin là protein có thể biến đổi cao, và chịu quá trình glycosyl hóa cũng như thủy phân protein sau quá trình dịch mã ở nhiều phần (Hassan, R., *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 10(12 Pt 1):3937, 2004). Dường như biến thể phiên mã 1 (Genbank NM_005823) biểu thị loại chính được thể hiện ở các dòng tế bào khối u được khảo sát cho đến nay, nhưng do ba biến thể cắt nối khác nhau đã được phát hiện, tính biến đổi được mở rộng đến mức độ phiên mã (Muminova, Z.E., *et al.*, *BMC Cancer*, 4:19, 2004; Hellstrom, I., *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15(5):1014, 2006). Do đó, kháng thể kháng endothelin hiệu quả bao gồm tính biến đổi ở kiểu glycosyl hóa mà biểu hiện các dạng khác nhau của mesothelin, nhưng cần phải được liên kết theo cách không thay đổi với epitop của mesothelin được biểu hiện trên bề mặt tế bào ung thư hoặc khối u có nguồn gốc từ những người bệnh khác nhau, không phụ thuộc vào tính biến đổi của cá thể.

Do đó, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tạo ra kháng thể mới liên kết đặc hiệu với MSLN, và kết quả là, đã phát minh ra kháng thể mới có ái lực cao với MSLN được biểu hiện quá mức ở tế bào ung thư, và phát hiện tiềm năng của kháng thể theo sáng chế làm tác nhân điều trị chống ung thư hiệu quả, và hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể mới liên kết đặc hiệu với

mesothelin (MSLN), axit nucleic mã hóa kháng thể này, vector và tế bào chủ chứa axit nucleic, phương pháp sản xuất kháng thể, và được phẩm điều trị bệnh ung thư hoặc khối u chứa kháng thể này làm thành phần hoạt tính.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất kháng thể mới liên kết đặc hiệu với mesothelin (MSLN).

Giải pháp kỹ thuật

Các phương án của sáng chế được phản ánh trong các điểm yêu cầu bảo hộ. Các biến thể kháng thể khác ngoài các loại đã được xác định trong bộ yêu cầu bảo hộ là các ví dụ tham khảo. Để đạt được các mục đích trên, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu mesothelin theo các điểm yêu cầu bảo hộ. Các phương án cũng như các ví dụ tham chiếu được đề xuất, bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, 15, 21, 27, hoặc 59; CDR2 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, 16, 22, 28, 60, 65, 71, 75, 80, 84, 121, 122, 123 hoặc 125; CDR3 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, 17, 23, 29, 61, 66, 72, 76, 81, 85, 124 hoặc 126.

Các phương án cũng như các ví dụ tham chiếu được đề xuất, bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, 18, 24, 30, 62, 67, 70, 77, 86 hoặc 117; CDR2 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, 19, 25, 63, 68, 73, 78 hoặc 82; CDR3 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, 20, 26, 64, 69, 74, 79, 83, 87, 118, 119 hoặc 120.

Hơn nữa, các phương án cũng như các ví dụ tham chiếu được đề xuất, bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 112, 113, 114, 115 hoặc 116 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 47, 52, 54, 56, 58, 109, 110 hoặc 111.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể đặc hiệu MSLN; và vector chứa axit nucleic này; và tế bào mà vector này được đưa vào đó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh ung thư hoặc khối u bao gồm kháng thể kháng MSLN làm thành phần hoạt tính.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 minh họa cấu trúc dự đoán của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của dòng MS502 trong số các kháng thể kháng mesothelin (MSLN).

FIG.2 minh họa so sánh tương đối giữa các thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ về lực liên kết.

FIG.3 minh họa so sánh tương đối giữa các thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng về lực liên kết.

FIG.4 minh họa vector biểu hiện MSLN trong dòng tế bào.

FIG.5 minh họa dạng tiền chất và dạng thành thực của MSLN trên SDS-PAGE.

FIG.6 minh họa phân tích mức biểu hiện của MSLN của các dòng tế bào và dòng tế bào khối u biểu hiện MSLN.

FIG.7 minh họa phân tích liên kết chọn lọc của các dòng tế bào biểu hiện MSLN bằng cách sử dụng kháng thể kháng mesothelin (MSLN) theo sáng chế.

FIG.8 minh họa giá trị MFI thu được bằng cách xác định liệu kháng thể kháng MSLN có liên kết với màng tế bào của khối u trung biểu mô (H226, H2052) và ung thư tụy (AsPC-1) hay không thông qua FACS.

FIG.9 minh họa kết quả thu được bằng cách xác nhận liệu kháng thể kháng MSLN theo sáng chế có liên kết chọn lọc với tế bào khối u biểu hiện MSLN không.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mesothelin” hoặc “MSLN” chỉ các biến thể, dạng đồng phân và loại tương đồng bất kỳ của MSLN của người mà được biểu

hiện tự nhiên bởi tế bào.

Thuật ngữ “mesothelin của người” chỉ trình tự mesothelin của người như trình tự axit amin đầy đủ của mesothelin của người có số truy nhập Genbank là NP_005814.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể đơn dòng có đặc trưng về mặt cấu trúc là liên kết đặc hiệu với mesothelin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 127 và tách biệt, chẳng hạn "dòng MI323", "dòng MI329", "dòng MI403" và "dòng MI407", và "dòng MS501", "dòng MS502", "dòng MS503", "dòng MS504", "dòng MS505" và "dòng MS506", và "dòng C2G1", "dòng C2G4", "dòng C3C8", "dòng 54", "dòng 56", "dòng 2-30", "dòng 2-73" và "dòng 2-78", và "dòng 56-C2G4", "dòng 2-30-C2G4", "dòng 2-73-C2G4" và "dòng 2-78-C2G4" được tạo ra.

Trình tự axit amin của CDR chuỗi nặng và CDR chuỗi nhẹ của mỗi kháng thể được thể hiện trong các bảng 2, 5, 12, và 16 dưới đây. Như được thể hiện trong các bảng 1, 4, 11, và 15, kháng thể kháng MSLN có thể gồm trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc trình tự có tính tương đồng với trình tự đó.

Theo phương án khác của sáng chế, từng dòng kháng thể riêng trong số các kháng thể tinh sạch, tức là, “dòng MI323”, “dòng MI329”, “dòng MI403”, “dòng MS502”, và “dòng C2G1”, “dòng C2G4”, “dòng C3C8”, và “dòng 56-C2G4”, “dòng 2-30-C2G4”, “dòng 2-73-C2G4” hoặc “dòng 2-78-C2G4” đối với MSLN tái tổ hợp của người, được chọn lọc bằng cách sử dụng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ), và đo lực liên kết định lượng bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học Biacore T-200 (GE Healthcare, Mỹ) (ví dụ 2-5, ví dụ 3-11, các ví dụ 3-14). Kết quả là, như được thể hiện trong các bảng 8, 14, và 18 dưới đây, tất cả các kháng thể dòng được tạo ra có ái lực với mesothelin mặc dù có sự khác nhau một chút.

Theo phương án khác của sáng chế, để đánh giá liệu kháng thể kháng MSLN có nguồn gốc từ thư viện miễn dịch và tổng hợp có liên kết chọn lọc với tế bào biểu

hiện MSLN không, mức biểu hiện của MSLN được đo ở dòng tế bào ung thư, và kháng thể liên kết với mỗi tế bào được xác nhận bằng thử nghiệm FACS. Kết quả là, như được minh họa trên FIG.5, xác định rằng các dòng tế bào H28, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1 là âm tính với MSLN, và H226, H2452(H2052), AsPC-1 dương tính với MSLN bằng cách đo xem có MSLN có dạng tiền chất kích thước 70kDa và dạng thành thực kích thước từ 40 đến 50kDa từ mỗi dòng tế bào ung thư không.

Ngoài ra, kết quả thu được bằng cách thực hiện phân tích liên kết chọn lọc của kháng thể kháng MSLN ứng viên với các dòng tế bào biểu hiện MSLN (H226, H2452(H2052), AsPC-1), như được minh họa trên FIG.8 và bảng 19, tất cả các kháng thể ứng viên MI323, MI329, MI403, MS502 đối với MSLN của dòng tế bào khối u trung biểu mô và dòng tế bào ung thư tụy có lực liên kết đáng kể mặc dù có sự khác nhau một chút về mức độ liên kết. Cụ thể là, kháng thể ứng viên MI323 có đặc tính liên kết tuyệt vời.

Hơn nữa, kết quả thu được bằng cách đánh giá liệu kháng thể ứng viên MI323 có đặc tính liên kết tuyệt vời đối với MSLN không, kháng thể ứng viên MS502 có dạng thức khác về giá trị Biacore K_D (Koff/Kon), và kháng thể ứng viên 2-78-C2G4 đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng được tạo ra từ kháng thể ứng viên MS502 được liên kết chọn lọc với tế bào khối u biểu hiện MSLN, ở tế bào MiaPaCa-MSLN #2 mà biểu hiện quá mức MSLN và MiaPaCa-2 không biểu hiện quá mức MSLN, như được minh họa trên FIG.9, các kháng thể ứng viên MI323, MS502, và 2-78-C2G4 có đặc tính liên kết tuyệt vời ở tế bào MiaPaCa-MSLN #2 biểu hiện quá mức MSLN so với MiaPaCa-2.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin (MSLN), tốt hơn là, kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin được thể hiện bởi trình tự SEQ ID NO: 127.

Kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin theo sáng chế khác biệt ở chỗ chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong

SEQ ID NO: 9, 15, 21, 27, hoặc 59; CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, 16, 22, 28, 60, 65, 71, 75, 80, 84, 121, 122, 123 hoặc 125; CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, 17, 23, 29, 61, 66, 72, 76, 81, 85, 124 hoặc 126.

Kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin theo sáng chế khác biệt ở chỗ gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, 18, 24, 30, 62, 67, 70, 77, 86 hoặc 117; CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, 19, 25, 63, 68, 73, 78 hoặc 82; CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, 20, 26, 64, 69, 74, 79, 83, 87, 118, 119 hoặc 120.

Theo sáng chế, kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự có mức độ tương đồng ít nhất là 80%, tốt hơn, mức độ tương đồng ít nhất là 90%, và tốt hơn nữa, mức độ tương đồng là 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 112, 113, 114, 115 hoặc 116, và kháng thể có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự có mức độ tương đồng ít nhất là 80%, tốt hơn, mức độ tương đồng ít nhất là 90%, và tốt hơn nữa, mức độ tương đồng là 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 47, 52, 54, 56, 58, 109, 110 hoặc 111.

Theo sáng chế, kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin khác biệt ở chỗ chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 46, 48, 51, 53, 55, 57, 112, 113, 114, 115 hoặc 116, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 47, 52, 54, 56, 58, 109, 110 hoặc 111, và kháng thể này có thể là kháng thể đơn dòng của người, nhưng không chỉ giới hạn ở kháng thể này.

Trình tự axit amin của kháng thể có thể được thay thế bằng sự thay thế bảo toàn. "Sự thay thế bảo toàn" chỉ sự cải biến chuỗi polypeptit gồm thay thế ít nhất một axit amin bằng axit amin có đặc tính sinh hóa tương tự với polypeptit tương ứng mà

không gây ra sự mất chức năng sinh học hoặc chức năng sinh hóa. “Sự thay thế axit amin bảo toàn” chỉ sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Các loại gốc axit amin có chuỗi bên tương tự được xác định trong lĩnh vực này. Các loại này bao gồm các axit amin có chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), axit amin có chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), axit amin có chuỗi bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), axit amin có chuỗi bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan), axit amin có chuỗi bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin), và axit amin có chuỗi bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Mong đợi rằng kháng thể theo sáng chế có thể vẫn giữ được hoạt tính trong khi có sự thay thế axit amin bảo toàn.

Thuật ngữ "gần như tương đồng" có nghĩa là khi hai loại axit nucleic hoặc hai loại polypeptit hoặc các trình tự chỉ định của nó được cạnh tranh và so sánh tối ưu, các axit nucleic và polypeptit có sự chèn hoặc loại bỏ nucleotit hoặc axit amin có sự giống nhau ít nhất là 80% với nucleotit hoặc axit amin, nhìn chung là, có sự giống nhau ít nhất là 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94% hoặc 95%, và tốt hơn nữa là ít nhất 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% hoặc 99,5% với nucleotit hoặc axit amin. Theo cách khác, nếu một đoạn được lai với sợi bổ sung của nó trong các điều kiện lai chọn lọc, có độ tương đồng đáng kể với axit nucleic. Sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic và trình tự polypeptit có mức độ tương đồng đáng kể về trình tự axit nucleic và trình tự axit amin cụ thể được mô tả trên đây.

Trong kháng thể theo sáng chế, ví dụ, các trình tự chuỗi nặng (V_H) CDR1, 2 và 3 và các trình tự chuỗi nhẹ (V_L) CDR1, 2 và 3 được thể hiện trong Bảng 2, Bảng 5, Bảng 12, và Bảng 16 có thể được tạo ra bằng cách trộn các trình tự chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nhẹ (V_L) tương tự về mặt cấu trúc để được sắp xếp trong CDR1, 2 và 3 của cặp chuỗi nặng (V_H) / chuỗi nhẹ (V_L).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" hoặc "chế phẩm kháng thể" chỉ chế phẩm chứa các phân tử kháng thể có một thành phần phân tử. Ở đây, chế phẩm kháng thể đơn dòng biểu thị tính đặc hiệu và ái lực liên kết đơn đối với epitop đặc hiệu. Do đó, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng của người" chỉ kháng thể có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch mắc nối của người, và thể hiện tính đặc hiệu liên kết đơn. Kháng thể người theo sáng chế có thể gồm gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch mắc nối của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến điểm đặc hiệu in vitro, hoặc bằng đột biến soma in vivo).

"Kháng thể" được sử dụng ở đây là phân tử globulin miễn dịch có tính phản ứng miễn dịch với kháng nguyên đặc hiệu, và chỉ phân tử protein tác động như thụ thể nhận diện đặc hiệu kháng nguyên, và có thể bao gồm toàn bộ kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng (kháng thể một dòng), kháng thể nguyên vẹn, và đoạn kháng thể. Ngoài ra, kháng thể có thể bao gồm kháng thể khảm (ví dụ, kháng thể chuột được làm tương thích với người) và phân tử lưỡng trị hoặc đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), đoạn kháng thể nhị hợp (diabody), trimer của đoạn kháng thể (triabody) và tetramer của đoạn kháng thể (tetrabody).

Kháng thể nguyên vẹn có cấu trúc gồm hai chuỗi nhẹ có chiều dài đủ và hai chuỗi nặng có chiều dài đủ, và mỗi chuỗi nhẹ có thể được nối với chuỗi nặng thông qua liên kết disulfit. Kháng thể nguyên vẹn gồm IgA, IgD, IgE, IgM, và IgG, và IgG là typ phụ, và gồm IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Đoạn kháng thể là đoạn vẫn giữ được chức năng liên kết với kháng nguyên, và gồm Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, và Fv, v.v..

Fab có cấu trúc gồm các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nhẹ và vùng hằng định thứ nhất (domain CH1) của chuỗi nặng, và có một vị trí liên kết với kháng nguyên. Fab' khác với Fab ở chỗ Fab' có vùng khớp nối gồm một hoặc nhiều gốc xystein ở đầu tận cùng C của domain CH1 của chuỗi nặng. Kháng thể F(ab')₂ được tạo ra bằng cách thu được liên kết disulfit của gốc

xystein trong vùng khớp nối của Fab'.

Fv (đoạn biến đổi) chỉ đoạn kháng thể nhỏ nhất chỉ có vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Trong Fv(dsFv) sợi kép, vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nối với nhau bằng liên kết disulfit. Trong Fv(scFv) chuỗi đơn, vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thường được nối với nhau bằng liên kết cộng hóa trị nhờ sử dụng cầu nối peptit. Các đoạn kháng thể này có thể thu được bằng cách sử dụng enzym thủy phân protein (ví dụ, Fab có thể thu được bằng cách cắt giới hạn kháng thể nguyên vẹn bằng papain, và đoạn F(ab')₂ có thể thu được bằng cách cắt bằng pepsin), và có thể được tạo cấu trúc bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp (ví dụ, khuếch đại bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction-phản ứng chuỗi trùng hợp) sử dụng ADN mã hóa chuỗi nặng của kháng thể hoặc vùng biến đổi của nó và ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó làm khuôn và sử dụng cặp mồi, và khuếch đại với tổ hợp gồm ADN mã hóa cầu nối peptit của cặp mồi cho phép cả hai đầu cuối của nó lần lượt liên kết với chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó và chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó).

Globulin miễn dịch có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng gồm vùng hằng định và vùng biến đổi (các vùng này còn được gọi là các domain). Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm 3 vùng đa khả dụng gọi là vùng quyết định bổ thể (sau đây gọi là "CDR"), và bốn vùng khung. CDR chủ yếu hoạt động để liên kết với epitop của kháng nguyên. Các CDR của các chuỗi tương ứng được gọi theo thứ tự là CDR1, CDR2, và CDR3 thường bắt đầu từ đầu tận cùng N, và còn được xác định bởi các chuỗi trong đó có các CDR đặc hiệu.

Kháng thể đơn dòng (kháng thể một dòng) được sử dụng ở đây chỉ phân tử kháng thể gồm một thành phần phân tử về cơ bản thu được trong cùng một quần thể kháng thể, và có thể có tính đặc hiệu và ái lực liên kết đơn nhất với một epitop đặc hiệu.

Kháng thể đơn dòng (kháng thể một dòng) được sử dụng ở đây là phân tử có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của người, và toàn bộ trình tự axit amin cấu tạo nên kháng thể gồm vùng quyết định bỏ thể, vùng cấu trúc được tạo cấu hình từ trình tự axit amin của globulin miễn dịch người. Kháng thể người thường được sử dụng trong điều trị bệnh cho người có lợi ở chỗ i) nó có thể tương tác tốt hơn với hệ miễn dịch của người, tiêu diệt hiệu quả hơn tế bào đích nhờ tính gây độc tế bào phụ thuộc bỏ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC) hoặc tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity - ADCC), ii) hệ miễn dịch của người không nhận diện kháng thể là vật liệu ngoại lai, và iii) thậm chí là khi một lượng thuốc nhỏ được đưa vào ít thường xuyên, thời gian bán hủy trong hệ tuần hoàn của người là tương tự như thời gian bán hủy của kháng thể có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "dòng MI323", "dòng MI329", "dòng MI403" và "dòng MI407" và "dòng MS501", "dòng MS502", "dòng MS503", "dòng MS504", "dòng MS505" và "dòng MS506" và "dòng C2G1", "dòng C2G4", "dòng C3C8", "dòng 54", "dòng 56", "dòng 2-30", "dòng 2-73" và "dòng 2-78" và "dòng 56-C2G4", "dòng 2-30-C2G4", "dòng 2-73-C2G4" và "dòng 2-78-C2G4" là các kháng thể liên kết đặc hiệu với MSLN được sử dụng ở đây chỉ các kháng thể liên kết với MSLN và gây ra sự ức chế hoạt tính sinh học của MSLN, và có thể được sử dụng bằng cách trộn kháng thể kháng MSLN.

Ở đây, "dòng MI323", "dòng MI329", "dòng MI403" và "dòng MI407" là các kháng thể thu được bằng cách gây miễn dịch chuột bằng MSLN tái tổ hợp của người, và dòng MS501", "dòng MS502", "dòng MS503", "dòng MS504", "dòng MS505" và "dòng MS506" là các kháng thể thu được từ biểu hiện thực khuẩn thể từ thư viện scFV, và "dòng C2G1", "dòng C2G4", "dòng C3C8", "dòng 54", "dòng 56", "dòng 2-30", "dòng 2-73" và "dòng 2-78" là các kháng thể thu được bằng cách đưa đột biến vào "dòng MS502" như được thể hiện trong bảng 9, và "dòng 56-C2G4", "dòng 2-30-

C2G4", "dòng 2-73-C2G4" và "dòng 2-78-C2G4" là các kháng thể được tạo ra bằng cách tổ hợp giữa các kháng thể được đưa đột biến vào.

K_D (hằng số phân ly cân bằng) của kháng thể với MSLN có thể được minh họa như sau.

(1) dòng MI323 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,8 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,8 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,8 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn,

(2) dòng MI329 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $3,5 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $3,5 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $3,5 \times 10^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn,

(3) dòng MI403 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $4,5 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $4,5 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $4,5 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn,

(4) dòng MS502 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $2,3 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $2,3 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $2,3 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn (xem Bảng 8),

(5) dòng C2G1 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $9,39 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $9,39 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $9,39 \times 10^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn,

(6) dòng C2G4 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $4,32 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $4,32 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $4,32 \times 10^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn,

(7) dòng C3C8 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,22 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,22 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,22 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn (xem Bảng 14),

(8) dòng 56 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,25 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,25 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,25 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ

hơn,

(9) dòng 2-30 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,66 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,66 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,66 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn,

(10) dòng 2-78 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,63 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,63 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,63 \times 10^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn,

(11) dòng 56-C2G4 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,63 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,63 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,63 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn,

(12) dòng 2-30-C2G4 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $2,34 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $2,34 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $2,34 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn,

(13) dòng 2-73-C2G4 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $1,65 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $1,65 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $1,65 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, và

(14) dòng 2-78-C2G4 có thể có hằng số phân ly cân bằng (K_D) là $3,72 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là, $3,72 \times 10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là, $3,72 \times 10^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn (xem Bảng 18).

Theo phương án khác của sáng chế, gen của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của chuột có nguồn gốc từ thư viện miễn dịch được liên kết với MSLN của người được xác định, gen của vùng biến đổi của chuỗi nặng được liên kết với globulin miễn dịch typ 1 của người của gen của vùng hằng định chuỗi nặng (vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1), và gen của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được liên kết với vùng hằng định của chuỗi nhẹ kappa của người, và các gen này lần lượt được chèn vào các vectơ biểu hiện protein cho tế bào động vật để tạo ra các vectơ, sau đó chuyển nhiễm trong dòng tế bào Expi293F™ và nuôi cấy tạo ra kháng thể, và

kháng thể thu được được tinh sạch bằng protein A để tạo ra kháng thể (Ví dụ 1-3).

Theo phương án khác nữa của sáng chế, gen của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ thư viện scFV tổng hợp được liên kết với MSLN của người được xác định, gen của vùng biến đổi của chuỗi nặng được liên kết với globulin miễn dịch typ 1 người của gen của vùng hằng định chuỗi nặng (vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1), và gen của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được liên kết với vùng hằng định của chuỗi nhẹ kappa của người, và các gen này lần lượt được chèn vào vector biểu hiện protein cho tế bào động vật để tạo ra các vector, sau đó chuyển nhiễm trong dòng tế bào Expi293F™ và nuôi cấy để tạo ra kháng thể, và kháng thể này được tinh sạch bằng protein A để tạo ra kháng thể (các ví dụ 2-4, 3-10, 3-12, và 3-13).

Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể này. Axit nucleic được sử dụng ở đây có thể có mặt ở tế bào, dịch ly giải tế bào, hoặc có thể còn có mặt ở dạng tinh sạch một phần hoặc dạng gần như tinh sạch. Axit nucleic “được phân lập” hoặc “gần như tinh khiết” khi nó được tinh sạch khỏi các thành khác của tế bào hoặc các chất tạp nhiễm khác, ví dụ, axit nucleic hoặc protein khác của tế bào bằng các kỹ thuật chuẩn gồm xử lý kiềm/SDS, phân lớp CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel agarosa, và các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực này. Axit nucleic theo sáng chế có thể là, ví dụ, ADN hoặc ARN, và có thể gồm trình tự intron, hoặc có thể không bao gồm trình tự intron.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất vector chứa axit nucleic. Để biểu hiện kháng thể hoặc đoạn kháng thể của nó, ADN mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có chiều dài một phần hoặc chiều dài đủ có thể thu được bằng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn (ví dụ, khuếch đại bằng PCR hoặc tách dòng cADN sử dụng tế bào lai mà biểu hiện kháng thể đích), và AND có thể “được liên kết hoạt động được” với các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã để được chèn vào vector biểu hiện.

Thuật ngữ “liên kết hoạt động được” được sử dụng ở đây có thể chỉ rằng gen kháng thể được gắn vào vector sao cho các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã trong vector có chức năng dự tính để kiểm soát quá trình phiên mã và dịch mã của gen kháng thể. Vector biểu hiện và trình tự kiểm soát biểu hiện được chọn sao cho có tính tương thích với tế bào chủ biểu hiện cần được sử dụng. Gen chuỗi nhẹ của kháng thể và gen chuỗi nặng của kháng thể được chèn vào các vector riêng, hoặc cả hai gen được chèn vào cùng một vector biểu hiện. Kháng thể được chèn vào vector biểu hiện bằng phương pháp chuẩn (ví dụ, gắn đoạn gen kháng thể và vị trí cắt bổ sung của enzym cắt giới hạn vào vector hoặc nếu hoàn toàn không có mặt vị trí cắt của enzym cắt giới hạn, thì gắn đầu bằng). Trong một số trường hợp, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu tạo thuận lợi cho việc tiết chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen chuỗi kháng thể có thể được tách dòng vào vector để peptit tín hiệu được liên kết với đầu tận cùng amino của gen chuỗi kháng thể theo khung. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (tức là peptit tín hiệu có nguồn gốc từ các protein ngoại trừ globulin miễn dịch). Ngoài ra, vector biểu hiện tái tổ hợp có trình tự điều hòa kiểm soát sự biểu hiện gen chuỗi kháng thể ở tế bào chủ. “Trình tự điều hòa” có thể bao gồm trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường và yếu tố kiểm soát biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu polyadenyl hóa) kiểm soát quá trình phiên mã hoặc dịch mã gen chuỗi kháng thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể biết rằng thiết kế của vector biểu hiện có thể khác nhau bằng cách thay đổi các trình tự điều hòa theo các yếu tố như chọn lựa tế bào chủ được biến nạp, mức độ biểu hiện của protein, v.v..

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vector. Axit nucleic hoặc vector được chuyển nhiễm vào tế bào chủ. Để “chuyển nhiễm”, nhiều loại kỹ thuật phổ biến khác nhau được sử dụng như điện di, kết tủa bằng canxi phosphat, chuyển nhiễm bằng DEAE-dextran, chuyển nhiễm liposom, v.v., có thể được sử dụng để đưa axit nucleic ngoại lai (ADN hoặc ARN) vào

tế bào chủ nhân sơ hoặc tế bào chủ nhân thật. Kháng thể theo sáng chế có thể được biểu hiện ở tế bào nhân thật, tốt hơn là, ở tế bào chủ động vật có vú, xét đến khả năng ứng dụng vào tế bào động vật có vú. Tế bào chủ động vật có vú thích hợp để biểu hiện kháng thể có thể bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO) (ví dụ, gồm tế bào dhfr- CHO được dùng cùng với dấu chuẩn chọn lọc DHFR), tế bào khối u tủy NSO, tế bào COS, hoặc tế bào SP2, v.v., làm ví dụ.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể, gồm bước nuôi cấy tế bào chủ để biểu hiện kháng thể. Nếu vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa gen kháng thể được đưa vào tế bào chủ động vật có vú, kháng thể có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để kháng thể được biểu hiện ở tế bào chủ, hoặc tốt hơn nữa là, trong khoảng thời gian đủ để kháng thể được tiết vào môi trường nuôi cấy trong đó tế bào chủ được nuôi cấy.

Trong một số trường hợp, kháng thể được biểu hiện có thể được tách từ tế bào chủ và được tinh chế cho đồng nhất. Quá trình tách hoặc tinh chế kháng thể có thể được thực hiện bằng phương pháp tách, phương pháp tinh chế thường được sử dụng đối với protein, ví dụ, sắc ký. Phương pháp sắc ký có thể bao gồm, ví dụ, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký kỵ nước gồm cột protein A và cột protein G. Ngoài sắc ký, kháng thể có thể được tách và tinh chế bằng cách kết hợp bổ sung với lọc, siêu lọc, loại muối, thẩm tách, v.v..

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất được phẩm điều trị bệnh ung thư hoặc khối u chứa kháng thể làm thành phần hoạt tính.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" hoặc "u" thường chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý của động vật có vú đặc trưng bởi sự sinh trưởng/tăng sinh tế bào không được kiểm soát. Ví dụ về bệnh ung thư bao gồm ung thư biểu mô, u lympho (ví dụ, u lympho Hodgkin và u lympho không Hodgkin), u nguyên bào, ung thư mô liên kết và bệnh bạch cầu, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Các ví dụ cụ thể hơn về bệnh ung thư bao gồm ung thư tế bào có vảy, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi không tế

bào nhỏ, ung thư biểu mô tuyến phổi, ung thư biểu mô tế bào vảy phổi, ung thư màng bụng, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày-ruột, ung thư tụy, u thần kinh đệm, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư tế bào gan, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư kết trực tràng, ung thư biểu mô nội mạc tử cung hoặc tử cung, ung thư biểu mô tuyến nước bọt, ung thư thận, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư âm hộ, ung thư tuyến giáp, ung thư biểu mô gan, bệnh bạch cầu và các rối loạn tăng sinh tế bào lympho khác, và các dạng ung thư đầu và cổ khác nhau. Bệnh ung thư theo sáng chế tốt hơn là bệnh ung thư dương tính với mesothelin, và được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư tụy, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư nội mạc tử cung, và khối u trung biểu mô.

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa lượng có hiệu quả chữa bệnh của kháng thể kháng MSLN và chất mang được dụng. "Chất mang được dụng" là vật liệu có thể được bổ sung vào thành phần hoạt tính để hỗ trợ cho việc bào chế hoặc tính ổn định của chế phẩm, và nó không gây ra các tác dụng gây độc bất lợi đáng kể cho người bệnh.

Chất mang chỉ chất mang hoặc chất pha loãng mà không ức chế hoạt tính sinh học và đặc tính của hợp chất được sử dụng mà không kích thích người bệnh. Chất mang được dụng trong thành phần được bào chế là dung dịch chất lỏng được vô trùng và phù hợp cho cơ thể sống. Nước muối, nước vô trùng, dung dịch Ringer, nước muối đệm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol có thể được sử dụng làm chất mang, hoặc ít nhất một thành phần của nó có thể được trộn để sử dụng, và các bất bổ trợ thông thường khác như chất chống oxi hóa, dung dịch đệm, tác nhân kìm vi khuẩn, v.v., có thể được bổ sung nếu cần. Ngoài ra, chế phẩm có thể được bào chế thành các dạng bào chế để tiêm, chẳng hạn dung dịch chứa nước, huyền phù, nhũ tương, v.v., viên tròn, viên nang, cốm hoặc viên nén bằng cách bổ sung thêm chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất liên kết và chất bôi trơn vào đó. Các chất mang khác được mô tả trong, ví dụ, [Remington's

Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin)]. Chế phẩm có thể chứa lượng có hiệu quả chữa bệnh của ít nhất một kháng thể kháng MSLN.

Chất mang được dụng bao gồm dung dịch hoặc chất phân tán trong nước vô trùng và bột vô trùng để điều chế dung dịch hoặc chất phân tán tiêm được vô trùng ngay khi dùng. Việc sử dụng môi trường và tác nhân như vậy cho các vật liệu được tính là đã biết trong lĩnh vực này. Chế phẩm tốt hơn là được bào chế để tiêm ngoài đường tiêu hóa. Chế phẩm có thể được bào chế dưới dạng dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc các cấu trúc được cho dùng khác phù hợp với nồng độ thuốc cao. Chất mang có thể là, ví dụ, dung môi hoặc môi trường phân tán chứa nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol và polyetylen glycol lỏng, v.v.,) và hỗn hợp thích hợp của chúng. Trong một số trường hợp, chế phẩm có thể bao gồm, tác nhân đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua. Dung dịch tiêm được vô trùng có thể được bào chế bằng cách đưa lượng hợp chất có hoạt tính cần thiết vào dung môi thích hợp với một loại trong số các thành phần được mô tả trên đây hoặc tổ hợp của chúng, sau đó thực hiện vi lọc vô trùng nếu cần. Nhìn chung, chất phân tán được điều chế bằng cách đưa hợp chất có hoạt tính vào chất mang vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác từ các thành phần được mô tả nêu trên. Bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm được vô trùng thu được bằng cách làm khô trong chân không và làm đông khô (khô lạnh) bột thành phần hoạt tính và bột thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch được lọc vô trùng trước đó.

Dược phẩm có thể được sử dụng theo đường uống hoặc ngoài đường tiêu hóa với liều dùng và tần suất có thể thay đổi tùy thuộc vào mức độ trầm trọng của người bệnh. Chế phẩm có thể được dùng cho người bệnh dưới dạng liều thuốc lớn hoặc bằng cách truyền liên tục nếu cần. Ví dụ, việc dùng liều lớn kháng thể theo sáng chế có mặt dưới dạng đoạn Fab có thể có lượng 0,0025 đến 100mg/kg trọng lượng cơ thể, 0,025 đến 0,25mg/kg, 0,010 đến 0,10mg/kg hoặc 0,10 đến 0,50mg/kg. Để truyền liên tục,

kháng thể theo sáng chế có mặt dưới dạng đoạn Fab có thể được dùng ở liều 0,001 đến 100 mg/kg kg/phút, 0,0125 đến 1,25mg/kg/phút, 0,010 đến 0,75mg/kg/phút, 0,010 đến 1,0mg/kg/phút hoặc 0,10 đến 0,50mg/kg/phút trong thời gian 1 đến 24 giờ, 1 đến 12 giờ, 2 đến 12 giờ, 6 đến 12 giờ, 2 đến 8 giờ, hoặc 1 đến 2 giờ. Nếu kháng thể theo sáng chế có mặt dưới dạng kháng thể có chiều dài đủ (có trọn vẹn vùng hằng định được sử dụng, lượng sử dụng có thể là 1 đến 10 mg/kg trọng lượng cơ thể, 2 đến 8 mg/kg, hoặc 5 đến 6 mg/kg. Kháng thể có chiều dài đủ thường được sử dụng qua đường truyền kéo dài trong 30 phút đến 35 phút. Tần suất sử dụng phụ thuộc vào mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh. Tần suất này có thể là 3 lần mỗi tuần đến một lần trong một tuần hoặc một lần trong hai tuần.

Ngoài ra, chế phẩm có thể được dùng cho người bệnh qua đường tiêm dưới da. Ví dụ, kháng thể kháng MSLN có lượng sử dụng là 10 đến 100 mg có thể được dùng mỗi tuần, mỗi hai tuần, hoặc mỗi tháng cho người bệnh thông qua đường tiêm dưới da.

Như được sử dụng ở đây, "lượng có hiệu quả chữa bệnh" chỉ lượng đủ để điều trị bệnh với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ chấp nhận được đối với điều trị y khoa, và lượng tổ hợp của kháng thể kháng MSLN. Lượng thực tế có thể thay đổi tùy thuộc vào một số yếu tố bao gồm các thành phần và đặc tính sinh lý của chế phẩm chữa bệnh, quần thể người bệnh dự tính, xét đến cá thể người bệnh, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các yếu tố này, và có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Khi xem xét một cách đầy đủ các yếu tố này, quan trọng là sử dụng một lượng tối thiểu đủ để thu được hiệu quả tối đa mà không có tác dụng phụ, và liều lượng này có thể được xác định dễ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Liều dùng của dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng được thay đổi theo các yếu tố khác nhau gồm tình trạng sức khỏe và cân nặng, mức độ trầm trọng của người bệnh, và loại thuốc, đường sử dụng, và thời gian sử dụng. Chế phẩm có thể được sử dụng theo đường mà thường được cho phép ở các động vật có vú gồm chuột, chuột nhắt, gia súc, người, v.v., ví dụ, theo đường miệng, trực tràng, tĩnh mạch,

dưới da, trong tử cung hoặc trong mạch máu não với lượng một liều hoặc nhiều liều mỗi ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với việc tham chiếu đến các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ sau chỉ để minh họa sáng chế, và sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng phạm vi của sáng chế không được hiểu là bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất kháng thể kháng MSLN từ thư viện miễn dịch

Dự tính sản xuất tác nhân điều trị là kháng thể kháng ung thư bằng cách sử dụng kháng thể kháng mesothelin (MSLN) được biểu hiện quá mức trên bề mặt tế bào ung thư.

1-1: Chọn lọc kháng thể kháng MSLN

Chuột được gây miễn dịch bằng MSLN tái tổ hợp của người và lách được lấy ra để tách tế bào lympho B. ARN tổng được tách từ tế bào lympho B và cADN được tổng hợp. Các gen kháng thể khác nhau của chuột được tách dòng từ cADN tổng hợp được bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR), và được chèn vào phagemit pComb3X để tạo ra thư viện kháng thể biểu hiện đoạn kháng thể có các trình tự khác nhau. Để tìm kháng thể liên kết đặc hiệu với MSLN của người từ thư viện kháng thể, hạt từ có MSLN được cố định trên đó được trộn với thư viện kháng thể, và các dòng được liên kết với kháng nguyên đích được tách và nuôi cấy. Sau đó, các dòng (MI323, MI329, MI403, và MI407) liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích (MSLN của người) được xác định riêng bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), và trình tự gen kháng thể và trình tự axit amin của nó được xác định bằng cách phân tích trình tự.

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 1, các dòng liên kết đặc hiệu với MSLN của người có thể được chọn, và trình tự axit amin của chúng được xác định.

Bảng 2 thể hiện trình tự axit amin CDR của các kháng thể dòng nêu trong Bảng 1 dựa trên đánh số Kabat.

【Bảng 1】

Dòng	Vùng biến đổi	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
MI323	chuỗi nặng	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYSFTSYFI QWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSGNTKYNEMFKG KATLAADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARS GGYQYYFDYWGQGTSTVTVSS	1
	chuỗi nhẹ	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAV AWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYPGVDPDRFTGSG SGTDFTFTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFG GGTKLEIKR	2
MI329	chuỗi nặng	EVMLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA MSWVRRTPDKRLEWVATINSYGSTFYPDSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCA RWGENWYFDVWGAGTTVTVSS	3
	chuỗi nhẹ	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNG NTYLHWYLNKPGQSPKLLIYKVSNRFGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHFPR FGGATKLEIKR	4
MI403	chuỗi nặng	EVQVVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYD MSWVRQTPEKRLWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDAMYYCA RQGTAVKNYWYFDVWGAGTSVTVSS	5
	chuỗi	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSS	6

	nhẹ	SYVHWYQQRPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFS GSGSGTDFTLNIHPVEEEDTGTYYCQHSWEIPFT FGSGTKLEIKR	
MI407	chuỗi nặng	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFPFSNYD MSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGNTYYPDTVK GRFTISRDNANKNTLYLQMSSLKSEDTALYFCVR QGTSVESYWYFDVWGAGTTVTVSS	7
	chuỗi nhẹ	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSS YIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSG SGSGTDFTLNIHPVEEDDTATYYCQHSWEIPFTF GSGTELEIKR	8

【Bảng 2】

Dòng	Vùng biến đổi	CDR1	CDR2	CDR3
MI323	chuỗi nặng	SYFIQ (SEQ ID NO: 9)	WIFPGSGNTKYN EMFKG (SEQ ID NO: 10)	SGGYQYYFD Y (SEQ ID NO: 11)
	chuỗi nhẹ	KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 12)	SASYRYP (SEQ ID NO: 13)	QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 14)
MI329	chuỗi nặng	SYAMS (SEQ ID NO: 15)	TINSDGSYTFYPD SVKG (SEQ ID NO: 16)	WGENWYFDV (SEQ ID NO: 17)
	chuỗi nhẹ	RSSQSLVHSNGN TYLH	KVSNRFS (SEQ ID NO: 19)	SQSTHFPRT (SEQ ID NO:

		(SEQ ID NO: 18)		20)
MI403	chuỗi nặng	SYDMS (SEQ ID NO: 21)	YISSGGGSTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 22)	QGTAVKKNYW YFDV (SEQ ID NO: 23)
	chuỗi nhẹ	RASQSVSTSSSS YVH (SEQ ID NO: 24)	YASNLES (SEQ ID NO: 25)	QHSWEIPFT (SEQ ID NO: 26)
MI407	chuỗi nặng	NYDMS (SEQ ID NO: 27)	YISSGGGNTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 28)	QGTSVESYW YFDV (SEQ ID NO: 29)
	chuỗi nhẹ	SVSTSSSSYIH (SEQ ID NO: 30)	YASNLES (SEQ ID NO: 25)	QHSWEIPFT (SEQ ID NO: 26)

1-2: Tách dòng gen IgG của kháng thể đơn dòng MI323, MI329, MI403, và MI407

Phagemit pComb3X chứa các gen mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của các kháng thể dòng MI323, MI329, MI403, và MI407 được tách chiết, và được dùng làm khuôn cho PCR với mỗi xuôi chứa NotI (Bảng 3: SEQ ID NO: 31 đến 34) và mỗi ngược chứa Apal (Bảng 3: SEQ ID NO: 35) bằng cách sử dụng hỗn hợp trộn trước Accupower Pfu PCR (Bioneer). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở nhiệt độ 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn lần lượt được xác nhận trên gel agarosa 1%, và được tách bằng kit tách trên gel. Sau đó, các gen tách được

được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn NotI, ApaI ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Vector plasmit pcIW chứa globulin miễn dịch typ 1 của người của gen vùng hằng định của chuỗi nặng (vùng hằng định chuỗi nặng IgG1) cũng được cắt bằng cùng phương pháp như nêu trên và được tách trên gel agarosa. Các gen vùng biến đổi chuỗi nặng riêng biệt của MI323, MI329, MI403, và MI407 được chèn vào vị trí NotI, ApaI của vector pcIW mạch thẳng chứa vùng hằng định của chuỗi nặng của người bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, New England BioLabs (NEB)). Vật liệu của phản ứng nối được biến nạp vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), cấy trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraiBiotech) chứa carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Sau đó, các khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy, và plasmit được tách bằng cách sử dụng kit plasmit mini (Cat.No.27405, QIAGEN), và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

Phagemit pComb3X chứa các gen mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của các kháng thể dòng MI323, MI329, MI403, và MI407 được tách chiết, và dùng làm khuôn cho PCR vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của các kháng thể dòng MI323, MI329, MI403, và MI407, trong đó PCR được thực hiện với mỗi xuôi chứa NotI (Bảng 3: SEQ ID NO: 36, 38, 40, 42) và mỗi ngược (Bảng 3: SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43) bằng cách sử dụng hỗn hợp trộn trước Accupower Pfu PCR. Ngoài ra, vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa của kháng thể người được đưa vào PCR với mỗi xuôi (Bảng 3: SEQ ID NO: 44) và mỗi ngược chứa HindIII (Bảng 3: SEQ ID NO: 45). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở nhiệt độ 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn lần lượt được xác nhận trên gel agarosa 1%, và được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của

chuỗi nhẹ tương ứng được trộn, sau đó tiến hành PCR gộp chồng, sao cho các gen biểu hiện vùng chuỗi nhẹ được tách dòng. PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, các gen tách được được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn NotI, HindIII ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Vector plasmit pcIW cũng được cắt bằng phương pháp tương tự như trên và được tách trên gel agarosa. Các gen vùng chuỗi nặng của MI323, MI329, MI403, và MI407 tách được được chèn vào vị trí NotI, HindIII của vector pcIW mạch thẳng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, New England BioLabs (NEB)). Vật liệu của phản ứng nối được biến nạp vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), được cấy trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraeBiotech) chứa carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy, và plasmit được tách bằng cách sử dụng kit plasmit mini (Cat.No.27405, QIAGEN), và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

【Bảng 3】

Tên	Trình tự nucleotit của ADN	SEQ ID NO:
MI323VH-F	GCGGCCGCCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTC ATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTCC AGCTGCAGCAGTCT	31
MI329VH-F	GCGGCCGCCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTC ATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTG	32

	ATGCTGGTGGAGTCT	
MI403VH-F	GCGGCCGCCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTC ATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTGC AGGTGGTGGAGTCT	33
MI407VH-F	GCGGCCGCCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTC ATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAGGTG AAGTTGGTGGAGTCT	34
VHApaI-R	ACCGATGGGCCCTTGGTGGA	35
MI323VL-F	GCGGCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATG CTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACTTGCGGGGAC ATTGTGATGACCCAGTCTCACAAA	36
MI323VLCL- R	ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTGATTTCAGT TTGGTCCCT	37
MI329VL-F	GCGGCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATG CTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACTTGCGGGGAC GTTGTGATGACCCAGACTCCACTC	38
MI329VLCL- R	ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTCAGCTCCAGC TTGGTC	39
MI403VL-F	GCGGCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATG CTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACTTGCGGGGAT ATTGTGATGACCCAGTCTCCTGCT	40
MI403VLCL- R	ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTTATTCCAAC TTTGTCCCCGA	41
MI407VL-F	GCGGCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTGATG CTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACTTGCGGGGAT ATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCT	42
MI407VLCL-	ACACTAGGAGCGGCCACGGTTCGTTTTATTCCAAC	43

R	TCTGTCCCCG	
Ck-F	ACCGTGGCCGCTCCTAGTGT	44
CkSHB-R	NNNNGGATCCAAGCTTACTAGCACTCCCC	45

1-3: Sản xuất và tinh sạch IgG các kháng thể dòng MI323, MI329, MI403, và MI407

Để sản xuất và tinh sạch các kháng thể dòng MI323, MI329, MI403, và MI407 kháng MSLN thu được bằng đáp ứng miễn dịch của chuột, tế bào Expi293F™ được chủng ở nồng độ $2,0 \times 10^6$ tế bào/mL vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Sau khi ủ (37°C , 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 24 giờ, môi trường biểu hiện Expi293™ (Cat.No.A1435101, Gibco) được bổ sung để điều chế 30mL sản phẩm có nồng độ là $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL (khả năng sống = 95%). 30 μg ADN (pcIW-chuỗi nặng kháng MSLN: 15 μg , pcIW-chuỗi nhẹ kháng MSLN: 15 μg) được pha loãng trong môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) để có tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. 1,5 mL môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) được trộn với 80 μL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) để tổng thể tích là 1,5mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau khi phản ứng trong 5 phút, 1,5 mL ADN được pha loãng và 1,5 mL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được pha loãng được trộn đều với nhau, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 đến 30 phút. 3mL hỗn hợp ADN và chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được xử lý trong các tế bào Expi293F™. Sau khi nuôi cấy huyền phù (37°C , 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 16 đến 18 giờ, 150 μL chất tăng cường 1 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) và 1,5 mL chất tăng cường 2 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy huyền phù trong 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 4000vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được cho qua bộ lọc cỡ 0,22 μm để được điều chế. MabSelect Xtra (Cat.No.17-5269-

02, GE Healthcare) là nhựa protein A có 100 μL được điều chế cho mỗi 30 mL dịch nuôi cấy, sau đó ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại dung dịch bảo quản, và rửa sản phẩm thu được bằng 400 μL dung dịch đệm liên kết protein A (Cat.No.21007, Pierce) 3 lần. Nhựa protein A được bổ sung vào dịch nuôi cấy điều chế được và cho phản ứng quay ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp dịch nuôi cấy và nhựa được đặt vào cột quay tròn nắp sập đục lỗ (Cat.No.69725, Thermo), và sau đó, chỉ nhựa được để lại trong cột nhờ sử dụng ống phân phối chân không QIAvac 24 Plus (Cat.No.19413, QIAGEN). 5 mL dung dịch đệm liên kết protein A được bổ sung để rửa nhựa, 200 μL dung dịch đệm rửa giải protein A (Cat.No.21009, Pierce) được bổ sung vào đó. Vật liệu thu được được cho phản ứng bằng cách tạo huyền phù lại ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 1 phút, và rửa giải. Mỗi dịch rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung 2,5 μL Tris-HCl 1,5M (pH 9,0). Tiến hành rửa giải 4 đến 6 lần, và định lượng mỗi phân đoạn bằng cách sử dụng Nanodrop 200C (Thermo Scientific). Các phân đoạn trong đó protein được phát hiện được thu gom, và trao đổi với dung dịch đệm PBS (Phosphate-Buffered Saline) nhờ sử dụng cột loại muối Zeba Spin, 7K MWCO, 5 mL (Cat.No.0089892, Pierce). Sau đó, tiến hành điện di protein (SDS-PAGE) trong điều kiện khử và không khử để xác nhận lần cuối việc định lượng nồng độ và tình trạng kháng thể, và giữ kháng thể ở nhiệt độ 4°C.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất kháng thể kháng MSLN từ thư viện scFv tổng hợp biểu hiện thực khuẩn thể

2-1: Chọn lọc kháng thể scFv kháng MSLN của người sử dụng biểu hiện thực khuẩn thể

Để sàng lọc sơ bộ, 1 mL 10^{13} hoặc hoặc nhiều hơn dung dịch gốc thư viện được cho phản ứng trong ống polystyren pha rắn (Cat.No.444202, Nunc) được phủ MSLN

ở nhiệt độ 37 °C trong 2 giờ. Đồng thời, 10 µL vi khuẩn XL1-blue (tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene) được nuôi cấy với 10 µL SB 10ml/tetracyclin và được cho sinh trưởng đến giá trị OD₆₀₀ bằng 0,8 đến 1,0. Dung dịch gốc thư viện thu được sau khi phản ứng ở 37°C trong 2 giờ được rửa bằng 5ml Tween 20 0,05%/PBS 4 lần, và từ bước sàng lọc thứ hai, số lần rửa bằng Tween 20 0,05%/PBS tăng theo sự tăng số lần sàng lọc. Sau đó, vật liệu thu được được nuôi cấy với 1%BSA/0,1M Glyxin pH 2,0 ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để tinh sạch phagemit. Phagemit tinh sạch được chuyển sang ống 50mL và được trung hòa bằng 70 µL Tris 2M. 9mL vi khuẩn XL1-blue (tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene) được xử lý, và 1 mL vi khuẩn được xử lý trong ống đã rửa. Vi khuẩn được gây nhiễm ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, và 10 mL SB, 20µL tetracyclin, 10 µL carbenixilin được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy huyền phù ở nhiệt độ 37°C và 220 vòng/phút trong 1 giờ. Sau đó, vi khuẩn được xử lý bằng 1 mL thực khuẩn thể hỗ trợ VCS M13 (10¹¹ pfu), và nuôi cấy huyền phù ở nhiệt độ 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ, và được xử lý bằng 80 mL SB, 100 µL kanamycin, và 100 µL carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C và ở 220 vòng/phút trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Vi khuẩn được nuôi cấy trên 12 giờ được ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút và ở 4°C trong 10 phút, và dịch nổi được chuyển vào ống mới. 20 mL PEG 20%/NaCl 15% được bổ sung vào đó, được trộn đều, và cho phản ứng trong nước đá trong 30 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ, và thu gom viên cặn và tạo huyền phù lại bằng 2 mL BSA 1%/PBS ở tốc độ 8000 vòng/phút, và ở 4°C trong 30 phút, và ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/phút và 4°C trong 10 phút. Ở đây, viên cặn thu gom được loại bỏ và 1 mL dịch nổi (2 mL) được bảo quản ở nhiệt độ -20°C và phần còn lại (1 mL) được sử dụng trong bước sàng lọc thứ tự sau đây.

2-2: Xác nhận chắc chắn các dòng riêng lẻ theo ELISA

Các khuẩn lạc đơn của quần thể được khuếch đại cuối cùng của thư viện scFv

tổng hợp biểu hiện thực khuẩn thể được thu gom, và nuôi cấy với 1,5 mL SB/carbenixilin đến giá trị OD 600 bằng 0,8 đến 1,0 ở nhiệt độ 37°C và ở 220 vòng/phút, và sau đó được nuôi cấy với 1 mM IPTG ở nhiệt độ 30°C và ở 200 vòng/phút trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các vật liệu phản ứng được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 5 phút, và chỉ mỗi dịch nổi được bổ sung vào đĩa ELISA chứa kháng nguyên MSLN ở dưới, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, vật liệu thu được được rửa bằng PBST (1XPBS, Tween 20 0,05%) 4 lần, và HRP/liên hợp kháng hFab-HRP được pha loãng theo tỷ lệ 1/5000 bằng BSA 1%/1XPBS được bổ sung vào đó, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và được rửa bằng PBST (1XPBS, Tween 20 0,05%) 4 lần. Sau đó, dung dịch TMB được bổ sung vào đó và cho phản ứng trong 5 đến 10 phút, và dung dịch dừng TMB được bổ sung vào đó. Tiếp theo, giá trị O.D. được đo ở bước sóng đo là 450 nm sử dụng ánh sáng TECAN, và các dòng có giá trị O.D. cao được xác nhận chắc chắn là các dòng riêng lẻ.

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 4, dòng liên kết đặc hiệu với MSLN của người có thể được chọn lọc, và trình tự axit amin của chúng được xác định.

Bảng 5 thể hiện trình tự axit amin CDR của các kháng thể dòng nêu trong Bảng 4 trên cơ sở đánh số Kabat.

【Bảng 4】

Dòng	Vùng biến đổi	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
MS501	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSGIYPDSGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNIYTFDYWGQGTLVTVSS	46
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNA VSWYQQLP GTAPKLLIYYNNQRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSL	47

		GYVFGGGTKLTVLG	
MS502	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSGIPPD SGSKYYADS VRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKNMLSFDYWGQGTLVTVSS	48
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNA VSWYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLN GYVFGGGTKVTVLG	49
MS502-1	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSGIPPD SGSKYYADS VRGRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKNMLSFDYWGQGTLVTVSS	48
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCICSSSNIGSNAV SWYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLNG YVFGGGTKLTVLG	50
MS503	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSSIYPGDGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKNAFTFDYWGQGTLVTVSS	51
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNA VSWYQQLPGTAPKLLIYYNSHRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDSSLS GYVFGGGTKLTVLG	52
MS504	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSSIYPNGSSKYYADS	53

		VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDMAVY YCAKNLLTFDYWGQGTLVTVSS	
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGPPGQRTISCTGSSSNIGNNS VSWYQQLPGTAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAIGGLRSEDEADYYCGAWDDSLN AYVFGGGTKLTVLG	54
MS505	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIYPDGSNKYYAD SVKGRFTVSRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARNAYTFDYWGQGTLVTVSS	55
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGSNAV SWYQQLPGTAPKLLIYYNSQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLNG YVFGGGTKLTVLG	56
MS506	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKGLEWVSSIYPGSGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNLYTFDYWGQGTLVTVSS	57
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGSNA VTWYQQLPGTAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGPRSEDEADYYCGAWDSSLS AYVFGGGTKLTVLG	58

【Bảng 5】

Dòng	Vùng biến đổi	CDR1	CDR2	CDR3
MS501	chuỗi	NYAMS	GIYPDSGSTYYA	NIYTFDY

	nặng	(SEQ ID NO: 59)	DSVKG (SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 61)cccc
	chuỗi nhẹ	SGSSSNIGSNAV S (SEQ ID NO: 62)	YNNQRPS (SEQ ID NO: 63)	GSWDSSLSGYV (SEQ ID NO: 64)
MS502	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDGSGSKYYA DSVRG (SEQ ID NO: 65)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNAV S (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)
MS502- 1	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDGSGSKYYA DSVRG (SEQ ID NO: 65)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	ICSSSNIGSNAV (SEQ ID NO: 70)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)
MS503	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	SIYPGDGSTYYA DSVKG (SEQ ID NO: 71)	NAFTFDY (SEQ ID NO: 72)
	chuỗi nhẹ	SGSSSNIGSNAV S (SEQ ID NO: 62)	YNSHRPS (SEQ ID NO: 73)	GTWDSSLSGYV (SEQ ID NO: 74)
MS504	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	SIYPNGSSKYYA DSVKG (SEQ ID NO: 75)	NLLTFDY (SEQ ID NO: 76)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGNNSV S	YDSHRPS (SEQ ID NO: 78)	GAWDDSLNAYV (SEQ ID NO: 79)

		(SEQ ID NO: 77)		
MS505	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	AIYPDGSNKYYA DSVKG (SEQ ID NO: 80)	NAYTFDY (SEQ ID NO: 81)
	chuỗi nhẹ	SGSSSNIGSNAV S (SEQ ID NO: 62)	YNSQRPS (SEQ ID NO: 82)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 83)
MS506	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	SIYPGSGSTYYA DSVKG (SEQ ID NO: 84)	NLYTFDY (SEQ ID NO: 85)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNAV T (SEQ ID NO: 86)	YDSHRPS (SEQ ID NO: 78)	GAWDSSLSAYV (SEQ ID NO: 87)

2-3: Tách dòng gen IgG của kháng thể kháng mesothelin

Phagemit pComb3X chứa gen mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của các kháng thể dòng MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, và MS506 đã xác nhận chắc chắn được tách chiết, và dùng làm khuôn cho PCR vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của các kháng thể dòng MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, và MS506, trong đó PCR được thực hiện với môi xuôi chứa NotI (SEQ ID NO: 86) và môi ngược (SEQ ID NO: 87) bằng cách sử dụng hỗn hợp trộn trước Accupower Pfu PCR. Ngoài ra, vùng hằng định của chuỗi nhẹ kappa của kháng thể người được đưa vào PCR với môi xuôi (Bảng 6: SEQ ID NO: 88) và môi ngược (Bảng 6: SEQ ID NO: 89). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách

bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của chuỗi nhẹ tương ứng được trộn, sau đó tiến hành PCR gói chồng, sao cho các gen biểu hiện vùng chuỗi nhẹ được tách dòng. PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, các gen tách được được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn NotI, HindIII ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Vector plasmit pcIW cũng được cắt bằng phương pháp tương tự như trên và được tách trên gel agarosa. Các gen vùng chuỗi nhẹ của MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, MS506 tách được được chèn vào vị trí NotI, HindIII của vector pcIW mạch thẳng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, New England BioLabs (NEB)). Vật liệu của phản ứng nối được biến nạp vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), được cấy trải trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraeBiotech) chứa carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy, và plasmit được tách bằng cách sử dụng kit plasmit mini (Cat.No.27405, QIAGEN), và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

Phagemit pComb3X chứa gen mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của các kháng thể dòng MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, và MS506 được tách chiết, và dùng làm khuôn cho PCR với môi xuôi chứa NotI (Bảng 6: SEQ ID NO: 90) và môi ngược chứa Apal (Bảng 6: SEQ ID NO: 91) bằng cách sử dụng hỗn hợp trộn trước Accupower Pfu PCR (Bioneer). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel

agaroza 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, các gen tách được được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn NotI, ApaI ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agaroza 1% lần nữa. Vector plasmit pcIW chứa globulin miễn dịch typ 1 của người của gen vùng hằng định của chuỗi nặng (vùng hằng định chuỗi nặng IgG1) cũng được cắt bằng phương pháp tương tự như trên và được tách trên gel agaroza. Gen vùng biến đổi chuỗi nặng của MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, và MS506 tách được được chèn vào vị trí NotI, ApaI của vector pcIW mạch thẳng chứa vùng hằng định chuỗi nặng của người bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, New England BioLabs (NEB)). Vật liệu của phản ứng nối được biến nạp vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), được cấy trải trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraiBiotech) chứa carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy, và plasmit được tách bằng cách sử dụng kit plasmit mini (Cat.No.27405, QIAGEN), và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

【Bảng 6】

Tên	Trình tự nucleotide	SEQ ID NO:
NotI-Trình tự dẫn đầu- VL-F	NNNNGCGGCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGT GCTGATGCTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACT TG CGGGCAGTCTGTGCTGACTCAGCCA	88
VL-R	GGGGTTGGCCTTGGGCTGGCCTAGGACCGTCAGC TTGGT	89
VL-CL-F	CAGCCCAAGGCCAACCCC	90
HindIII-VL-R	NNNNGGATCCAAGCTTACTAACATTCTGTAGGGG CCACTGTC	91
HD-chuỗi nặng-F	GGTGTCCAGGCGGCCGCCATGTACTTGGGACTGA	92

	ACTATGTATTCATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTC CAGAGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG	
HD-chuỗi nặng-R	GGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTG AGCTCACGGTGACCAGTGT	93

2-4: Sản xuất và tinh sạch IgG của các kháng thể dòng MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, MS506

Để sản xuất và tinh sạch các kháng thể dòng MS501, MS502, MS503, MS504, MS505, MS506 thu được từ thư viện scFv biểu hiện thực khuẩn thể, tế bào Expi293F™ được chủng ở nồng độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Sau khi ủ (37°C , 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 24 giờ, môi trường biểu hiện Expi293™ (Cat.No.A1435101, Gibco) được bổ sung để điều chế 30mL sản phẩm có nồng độ là $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL (khả năng sống = 95%). 30μg ADN (vùng biến đổi của chuỗi nặng pcIw-MS502: 15 μg, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ pcIw-kháng-Mesothelin: 15 μg) được pha loãng trong môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) để có tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. 1,5 mL môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) được trộn với 80 μL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) để tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau khi phản ứng trong 5 phút, 1,5 mL ADN được pha loãng và 1,5 mL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được pha loãng được trộn đều với nhau, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 đến 30 phút. 3 mL hỗn hợp ADN và chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được xử lý trong các tế bào Expi293F™. Sau khi nuôi cấy huyền phù (37°C , 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 16 đến 18 giờ, 150 μL chất tăng cường 1 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) và 1,5 mL chất tăng cường 2 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy huyền phù trong 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly

tâm ở tốc độ 4000vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được cho qua bộ lọc cỡ 0,22 μ m để được điều chế. MabSelect Xtra (Cat.No.17-5269-02, GE Healthcare) là nhựa protein A có 100 μ L được điều chế cho mỗi 30 mL dịch nuôi cấy, sau đó ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại dung dịch bảo quản, và sản phẩm được rửa bằng 400 μ L dung dịch đệm liên kết protein A (Cat.No.21007, Pierce) 3 lần. Nhựa protein A được bổ sung vào dịch nuôi cấy điều chế được và cho phản ứng quay ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp dịch nuôi cấy và nhựa được đặt vào cột quay đục lỗ nắp sập (Cat.No.69725, Thermo), và sau đó, chỉ nhựa được để lại trong cột nhờ sử dụng ống phân phối chân không QIAvac 24 Plus (Cat.No.19413, QIAGEN). 5 mL dung dịch đệm liên kết protein A được bổ sung để rửa nhựa, 200 μ L dung dịch đệm rửa giải protein A (Cat.No.21009, Pierce) được bổ sung vào đó. Vật liệu thu được được cho phản ứng bằng cách tạo huyền phù lại ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 1 phút, và rửa giải. Mỗi dịch rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung 2,5 μ L Tris-HCl 1,5M (pH 9.0). Tiến hành rửa giải 4 đến 6 lần, và định lượng mỗi phân đoạn bằng cách sử dụng Nanodrop 200C (Thermo scientific). Các phân đoạn trong đó protein được phát hiện được thu gom, và trao đổi với dung dịch đệm PBS (Phosphate-Buffered Saline) nhờ sử dụng cột loại muối Zeba Spin, 7K MWCO, 5 mL (Cat.No.0089892, Pierce). Sau đó, tiến hành điện di protein (SDS-PAGE) trong điều kiện khử và không khử để xác nhận lần cuối việc định lượng nồng độ và tình trạng kháng thể, và giữ kháng thể ở nhiệt độ 4°C.

2-5: Đo lực liên kết định lượng của kháng thể kháng MSLN với kháng nguyên

Lực liên kết định lượng (ái lực) của kháng thể kháng MSLN tinh sạch, tức là, các kháng thể dòng MI323, MI329, MI403, MS502 đối với mesothelin tái tổ hợp của người (MSLN) được đo bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học Biacore T-200 (GE Healthcare, Mỹ). MSLN (Cat.No.3265-MS, R&D systems) được tinh sạch từ tế bào HEK293 được cố định lên chip CM5 (GE Healthcare, Mỹ) để thỏa mãn 200 Rmax bằng cách sử dụng phản ứng amin-carboxylic. Sau đó, kháng thể dòng C2G1, kháng

thể dòng C2G4 hoặc kháng thể dòng C3C8 được pha loãng tuần tự bằng dung dịch đệm HBS-EP (10mM HEPES, pH7,4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20) được để chảy ở khoảng nồng độ 0,078nM đến 5nM và ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút để liên hợp trong 120 giây và phân ly trong 1800 giây. Sự phân ly của kháng thể được liên kết với MSLN được gây ra bằng cách cho chảy Glyxin-HCl 10 mM pH 1,5 ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút trong 30 giây (Bảng 7). Ái lực thu được dưới dạng hằng số tốc độ chuyển động (K_{on} và K_{off}) và hằng số phân ly cân bằng (K_D) bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T-200 (Bảng 8).

【Bảng 7】

SPR	Biacore T200
Chip	CM5
Dung dịch đệm chạy	HBS-EP pH7.4
Tốc độ dòng	30 μ L/phút
Thời gian liên hợp/phân ly	120 giây / 600 giây
Nồng độ IgG	0,078~5nM, 1/2 độ pha loãng tuần tự
Phục hồi	10mM Glyxin-HCl pH1,5, 30 giây

【Bảng 8】

	K_{on}	K_{off}	K_D
MI323	$2,7 \times 10^5$	$4,8 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-10}$
MI329	$1,4 \times 10^6$	$5,1 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-11}$
MI403	$8,9 \times 10^4$	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-10}$
MS502	$1,9 \times 10^7$	$4,3 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-10}$

Ví dụ 3: Phương pháp sản xuất kháng thể thành thực có ái lực dòng MS502

3-1: Thiết kế thư viện thành thực ái lực dòng MS502

Trình tự axit amin của dòng MS502 kháng mesothelin được đưa vào trang chủ

mô hình của Thụy Sĩ (<http://swissmodel.expasy.org/>) để tìm trình tự khuôn. 50 trình tự được tìm thấy dựa trên các trình tự tương đồng, và tiến hành lập mô hình bằng cách lựa chọn mỗi trình tự làm khuôn. 50 trình tự được liệt kê theo thứ tự ưu tiên dựa vào giá trị QMEAN4 (C β , tất cả nguyên tử, solvat hóa, độ xoắn), và khuôn được lựa chọn có xét đến mức độ tương đồng về trình tự và độ phân giải ngoài các giá trị QMEAN4. 3g6a.1.B được lựa chọn cho vùng biến đổi của chuỗi nặng, và 3qhz.1.B (LCDR1,2) và 4o5l.1.A (LCDR3) được lựa chọn cho vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Cấu trúc MS502 thu được dựa trên khuôn được lựa chọn được phân tích bằng chương trình pymol, và paratop được chọn dựa trên axit amin nhô ra của CDR (xem FIG.1). Trong số chúng, VL CDR2 Y49, Y50, K53 được loại ra khỏi các axit amin đề xuất đột biến mặc dù được dự đoán rằng chúng là các paratop bởi vì Tyr và Lys là các axit amin thường có tác động tích cực lên liên kết. Việc đưa vào đột biến được thiết kế bằng cách bảo toàn 50% trình tự đã có, tăng tỷ lệ Tyr, Ser, Gly, và kiểm soát trình tự nucleotit sử dụng mỗi trộn bằng tay (IDT, Mỹ) sao cho tỷ lệ ưa nước, kỵ nước, điện tích dương, và điện tích âm được bao gồm đều nhau (Bảng 9). Vùng biến đổi của chuỗi nặng được chia thành mỗi trong số ba đoạn bởi vì đột biến được đưa vào cả CDR1, 2, và 3, và chúng được đưa vào PCR đoạn và PCR gói chông để tạo cấu trúc thư viện, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chia thành mỗi trong số hai đoạn bởi vì đột biến được đưa vào chỉ CDR1 và 3, và chúng được đưa vào PCR đoạn và PCR gói chông để tạo cấu trúc thư viện. Kích thước theo lý thuyết của thư viện theo việc đưa đột biến vào trong trường hợp vùng biến đổi của chuỗi nặng là $5,83 \times 10^{10}$, và kích thước theo lý thuyết của thư viện theo việc đưa đột biến vào trong trường hợp vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là $2,16 \times 10^4$.

【Bảng 9】

HCDR1											
N31				Y32				A33			
Tyr	7	THR	7	Tyr	49	THR	1	Tyr	0.5	THR	7
Ser	8	Gln	0	Ser	8	Gln	0	Ser	7.5	Gln	0.5
Gly	1	Asn	49	Gly	1	Asn	7	Gly	7	Asn	0.5
Arg	1	Ala	1	Arg	1	Ala	1	Arg	1.5	Ala	49
Lys	0	Val	1	Lys	0	Val	1	Lys	0.5	Val	7
His	7	Leu	1	His	7	Leu	1	His	0.5	Leu	1.5
Glu	0	Met	0	Glu	0	Met	0	Glu	3.5	Met	0.25
Asp	7	Ile	7	Asp	7	Ile	1	Asp	3.5	Ile	0.75
Phe	1	Pro	1	Phe	7	Pro	1	Phe	0.5	Pro	7
TRP	0	Cys	1	TRP	0	Cys	7	TRP	0.25	Cys	0.5
		STOP	0			STOP	0			STOP	0.75

HCDR2											
D53				G55				S56			
Tyr	7	THR	1	Tyr	0.5	THR	1	Tyr	17.5	THR	7
Ser	2	Gln	0	Ser	4.5	Gln	0.5	Ser	49	Gln	0
Gly	7	Asn	7	Gly	49	Asn	0.5	Gly	0	Asn	2.5
Arg	1	Ala	7	Arg	10.5	Ala	7	Arg	0	Ala	7
Lys	0	Val	7	Lys	0.5	Val	7	Lys	0	Val	0.5
His	7	Leu	1	His	0.5	Leu	1.5	His	2.5	Leu	0.5
Glu	0	Met	0	Glu	3.5	Met	0.25	Glu	0	Met	0
Asp	49	Ile	1	Asp	3.5	Ile	0.75	Asp	2.5	Ile	0.5
Phe	1	Pro	1	Phe	0.5	Pro	1	Phe	3.5	Pro	7
TRP	0	Cys	1	TRP	1.75	Cys	3.5	TRP	0	Cys	0
		STOP	0			STOP	2.25			STOP	0

HCDR3											
L98				S99				F100			
Tyr	0.5	THR	1	Tyr	14	THR	7	Tyr	10.5	THR	1.5
Ser	1.5	Gln	3.5	Ser	49	Gln	0	Ser	7.75	Gln	0
Gly	1	Asn	0.5	Gly	0	Asn	2	Gly	0.25	Asn	2.25
Arg	7.5	Ala	1	Arg	0	Ala	7	Arg	0.5	Ala	0.5
Lys	0.5	Val	7	Lys	0	Val	1	Lys	0	Val	3.5
His	3.5	Leu	52.5	His	2	Leu	1	His	1.5	Leu	7
Glu	0.5	Met	1.75	Glu	0	Met	0	Glu	0	Met	0
Asp	0.5	Ile	5.25	Asp	2	Ile	1	Asp	0.75	Ile	10.5
Phe	3.5	Pro	7	Phe	7	Pro	7	Phe	49	Pro	1
TRP	0.25	Cys	0.5	TRP	0	Cys	0	TRP	0	Cys	3.5
		STOP	0.75			STOP	0			STOP	0

LCDR1											
S30											
Tyr	18.8	THR	7								
Ser	52.5	Gln	0								
Gly	0	Asn	2.5								
Arg	0	Ala	7								
Lys	0	Val	0.5								
His	2.5	Leu	0.5								
Glu	0	Met	0								
Asp	2.5	Ile	0.5								
Phe	3.75	Pro	7								
TRP	0	Cys	0								
		STOP	0								

LCDR3											
W92				S94				N95b			
Tyr	0	THR	2	Tyr	14	THR	7	Tyr	7	THR	7
Ser	14	Gln	0	Ser	49	Gln	0	Ser	8	Gln	0
Gly	6	Asn	0	Gly	0	Asn	2	Gly	1	Asn	49
Arg	12	Ala	2	Arg	0	Ala	7	Arg	1	Ala	1
Lys	0	Val	2	Lys	0	Val	1	Lys	0	Val	1
His	0	Leu	16	His	2	Leu	1	His	7	Leu	1
Glu	0	Met	2	Glu	0	Met	0	Glu	0	Met	0
Asp	0	Ile	0	Asp	2	Ile	1	Asp	7	Ile	7
Phe	0	Pro	2	Phe	7	Pro	7	Phe	1	Pro	1
TRP	42	Cys	0	TRP	0	Cys	0	TRP	0	Cys	1
		STOP	0			STOP	0			STOP	0

3-2: Tạo cấu trúc thư viện vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

Để đưa đột biến vào thư viện, trước tiên, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chia thành 2 phần, và chúng được đưa vào PCR đoạn. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đoạn số 1 có trình tự gen vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng MS502 kháng mesothelin làm khuôn, và mỗi xuôi (SEQ ID NO: 93) và mỗi ngược (SEQ ID NO: 94) được bổ sung vào đó, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đoạn số 2 có trình tự gen vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng MS502 kháng mesothelin làm khuôn, và mỗi xuôi (Bảng 10: SEQ ID NO: 95) và mỗi ngược (Bảng 10: SEQ ID NO: 96) được bổ sung vào đó, và sau đó, mỗi đoạn được đưa vào PCR sử dụng hỗn hợp trộn sẵn polymeraza Primestar (Takara). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 98°C trong 2 phút, và sau đó đặt ở 98°C trong 10 giây, ở 60°C trong 15 giây, và ở 72°C trong 20 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách nhờ sử dụng kit tách chiết trên gel (QIAquick Gel Extraction Kit, CAT. NO. 28706, QIAGEN). Vùng hằng định chuỗi nhẹ có vùng chuỗi nhẹ lambda làm khuôn, và mỗi xuôi (Bảng 10: SEQ ID NO: 97), và mỗi ngược (Bảng 10: SEQ ID NO: 98) được bổ sung vào đó, và mỗi đoạn được đưa vào PCR sử dụng hỗn hợp trộn sẵn polymeraza Primestar. PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 98°C trong 2 phút, và sau đó đặt ở 98°C trong 10 giây, ở 60°C trong 15 giây, và ở 72°C trong 30 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đoạn số 1 và 2 đã xác nhận chắc chắn, và vùng hằng định chuỗi nhẹ với tỷ lệ mol là 1:1:1 được sử dụng làm khuôn, và mỗi xuôi (SEQ ID NO: 92) và mỗi ngược (SEQ ID NO: 98) được bổ sung vào đó, và mỗi đoạn được đưa vào PCR sử dụng hỗn hợp trộn sẵn polymeraza Primestar. PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 98°C trong 2 phút, và sau đó đặt ở 98°C trong 20 giây, ở 60°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 60 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10

phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và được tách nhờ sử dụng kit tách chiết trên gel để xác nhận chắc chắn gen thành thực ái lực vùng biến đổi-hằng định của chuỗi nhẹ. Gen được xác nhận chắc chắn được cho phản ứng với enzyme cắt giới hạn NruI và XbaI (NEB) ở 37°C trong 4 giờ. Các gen được cho phản ứng với enzyme cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Gen tách được được chèn vào vị trí NruI, XbaI của vector pComb3x mạch thẳng chứa vùng biến đổi- hằng định chuỗi nặng của MS502 bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, NEB). Vật liệu phản ứng nối được chuyển vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), và được nuôi cấy trong 300mL môi trường LB ở 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ. Sau đó, vật liệu thu được được xử lý bằng 150 μ L carbenixilin và 300 μ L tetracyclin, và được nuôi cấy kèm lắc ở 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ. Vật liệu thu được được xử lý bằng thực khuẩn thể hỗ trợ VCS M13 4,5 mL (10^{11} pfu) và được nuôi cấy kèm lắc ở 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ, và được xử lý bằng 300 μ L kanamycin và 300 μ L carbenixilin, và nuôi cấy qua đêm ở 37°C và ở 220 vòng/phút. Ngày tiếp theo, tế bào nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được chuyển sang bình mới. Để kết tủa thực khuẩn thể, PEG/NaCl 5X được dùng để bổ sung PEG/NaCl 1X vào dịch nổi, và sản phẩm thu được được để tĩnh trên nước đá trong 30 phút. Thực khuẩn thể kết tủa được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch nổi được loại bỏ và thực khuẩn thể kết tủa được tạo huyền phù lại bằng 10 mL PBS. Để loại xác tế bào, thực khuẩn thể được hòa tan trong 10mL PBS được ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút để tách dịch nổi, và bảo quản ở 4°C. Kích thước thư viện được xác nhận bằng cách lấy 100 μ L dịch nuôi cấy sau 1 giờ biến nạp, cấy trải dịch nuôi cấy trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraiBiotech) chứa carbenixilin theo cách thức pha loãng tuần tự, nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và đếm khuẩn lạc.

3-3: Tạo cấu trúc thư viện vùng biến đổi chuỗi nặng

Để đưa đột biến vào thư viện, trước tiên, vùng biến đổi của chuỗi nặng được chia thành 3 phần, và chúng được đưa vào PCR đoạn. Vùng biến đổi của chuỗi nặng đoạn số 1 có trình tự gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng MS502 kháng mesothelin làm khuôn, và mỗi xuôi (Bảng 10: SEQ ID NO: 99) và mỗi ngược (Bảng 10: SEQ ID NO: 100) được bổ sung vào đó, và vùng biến đổi của chuỗi nặng đoạn số 2 có trình tự gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng MS502 kháng mesothelin làm khuôn, và mỗi xuôi (Bảng 10: SEQ ID NO: 101) và mỗi ngược (Bảng 10: SEQ ID NO: 102) được bổ sung vào đó, và vùng biến đổi của chuỗi nặng đoạn số 3 có trình tự gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng MS502 kháng mesothelin làm khuôn, và mỗi xuôi (Bảng 10: SEQ ID NO: 103) và mỗi ngược (Bảng 10: SEQ ID NO: 104) được bổ sung vào đó, và sau đó, mỗi đoạn được đưa vào PCR sử dụng hỗn hợp trộn sẵn polymeraza Primestar (Takara). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 98°C trong 2 phút, và sau đó đặt ở 98°C trong 10 giây, ở 60°C trong 15 giây, và ở 72°C trong 20 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Vùng biến đổi chuỗi nặng các đoạn 1, 2, và 3 được xác nhận chắc chắn với tỷ lệ mol là 1:1:1 được sử dụng làm khuôn, và mỗi xuôi (Bảng 10: SEQ ID NO: 99) và mỗi ngược (Bảng 10: SEQ ID NO: 106) được bổ sung vào đó, và mỗi đoạn được đưa vào PCR sử dụng hỗn hợp trộn sẵn polymeraza Primestar. PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 98°C trong 2 phút, và sau đó đặt ở 98°C trong 20 giây, ở 60°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 60 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và được tách nhờ sử dụng kit tách chiết trên gel để đảm bảo gen thành thực ái lực vùng biến đổi chuỗi nặng. Gen đã xác nhận chắc chắn được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn XhoI và ApaI (NEB) ở 37°C trong 4 giờ. Các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Gen tách

được được chèn vào vị trí XhoI, ApaI của vector pComb3x mạch thẳng chứa vùng biến đổi-hằng định chuỗi nhẹ của MS502 bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, NEB). Vật liệu phản ứng nối được chuyển vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), và được nuôi cấy trong 300mL môi trường LB ở 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ. Sau đó, vật liệu thu được được xử lý bằng 150 μ L carbenixilin và 300 μ L tetracyclin, và được nuôi cấy huyền phù ở nhiệt độ 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ. Vật liệu thu được được xử lý bằng thực khuẩn thể hỗ trợ VCS M13 4,5mL (10^{11} pfu) và được nuôi cấy kèm lắc ở 37°C và ở 220 vòng/phút trong 1 giờ, và được xử lý bằng 300 μ L kanamycin và 300 μ L carbenixilin, và nuôi cấy qua đêm ở 37°C và ở 220 vòng/phút. Ngày tiếp theo, tế bào nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được chuyển sang bình mới. Để kết tủa thực khuẩn thể, PEG/NaCl 5X được dùng để bổ sung PEG/NaCl 1X vào dịch nổi, và sản phẩm thu được được để tĩnh trên nước đá trong 30 phút. Thực khuẩn thể kết tủa được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch nổi được loại bỏ và thực khuẩn thể kết tủa được tạo huyền phù lại bằng 10 mL PBS. Để loại xác tế bào, thực khuẩn thể được hòa tan trong 10mL PBS được ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút để tách dịch nổi, và bảo quản ở 4°C. Kích thước thư viện được xác nhận bằng cách lấy 100 μ L dịch nuôi cấy sau 1 giờ biến nạp, cấy trải dịch nuôi cấy trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraiBiotech) chứa carbenixilin theo cách thức pha loãng tuần tự, nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và đếm khuẩn lạc.

【Bảng 10】

Tên	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
MS502 VL FR1 Fo NruI	GC Tcgcgattgcagtggcactggctgggttcgctaccgtggcccaggcggcc CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA	94

MS502 VL FR1 Fo	CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA	95
MS502 VL FR1 Re	GAG CTG CTG GTA CCA GGA GAC AGC ATT RX5X4 GCC AAT ATT AGA TGA AGA GCC AGT ACA AGA	96
MS502 VL FR2 Fo	GCC AAT ATT AGA TGA AGA GCC AGT ACA AGA	97
MS502 VL FR2 Re	ACC TAG GAC GGT CAC CTT GGT GCC TCC GCC GAA GAC ATA ACC RX3X3 CAG GCT RX7X4 ATC CX8X4 AGA ACC ACA GTA ATA ATC AGC CTC ATC CTC GGA	98
MS502 CL Fo	GGC ACC AAG GTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCC AAC CCC ACT GTC	99
MS502 CL Re	GCT CTA GAA CAT TCT GTA GGG GCC ACT GTC TTC TC	100
MS502 VH FR1 Fo NcoI	gcccatggcc GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG	101
MS502 VH FR1 Re	AGC CTG GCG GAC CCA GCT CAT NX1X2 RX3X4 RX3X3 GCT AAA GGT GAA TCC AGA GGC CGC ACA	102
MS502 VH FR2 Fo	atgagctgggtccgccaggct	103
MS502 VH FR2 Re	GGT GAA CCG ACC TCT TAC AGA ATC AGC GTA ATA TTT RX5X4 NX2X2 ACT RX3X2 AGG AGG GAT CCC TGA GAC CCA CTC	104
MS502 VH FR3 Fo	AAA TAT TAC GCT GAT TCT GTA AGA GGT CGG TTC ACC	105
MS502 VH FR3 Re	TGA GCT CAC CGT GAC CAG TGT ACC CTG GCC CCA GTA GTC RX6X6 RX7X4 NX4X1 CAT ATT	106

	TTT CGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT	
MS502 VH Re	TGA GCT CAC CGT GAC CAG TGT ACC CTG	107
MS502 VH Re ApaI	GCG GGC CCT TGG TGG AGG CTG AGC TCA CCG TGA CCA GTG TAC CCT G	108

Trong Bảng 10, codon X là codon thoái hóa trong đó mỗi ACGT được kiểm soát ở tỷ lệ cụ thể, và có thể kiểm soát tỷ lệ axit amin được dịch mã. Ví dụ, đối với codon NX1X2 của SEQ ID NO: 102, N được mã hóa bởi A, C, G, T với tỷ lệ ngẫu nhiên, X1 được mã hóa ở 10% A, 10% C, 70% G, và 10% T, và X2 được mã hóa ở 10% A, 70% C, 10% G, và 10% T. Tỷ lệ này được thiết kế cho mỗi ngược, và do đó, nếu nó được chuyển thành chiều xuôi, nó là codon X2X1N, trong đó X2 được mã hóa ở 10% A, 70% C, 10% G, và 10% T, và X1 được mã hóa ở 10% A, 10% C, 70% G, và 10% T. Kết quả là, Kabat số 31 của vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR1 được dịch mã thành axit amin, Tyr 7%, Ser 8%, Gly 1%, His 7%, Asp 7%, Phe 1%, Thr 7%, Asn 49%, Ala 1%, Val 1%, Leu 1%, Ile 7%, Pro 1%, Cys 1%.

3-4: Chọn lọc kháng thể đột biến ở vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

1 mL protein tái tổ hợp của người MSLN có nồng độ là 1 µg/mL được đặt trong ống polystyren pha rắn (Cat.No.444202, Nunc), và ống được phủ ở 4°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn được rửa bằng 5 mL 0,05% PBST ba lần. 5 mL 1%BSA/PBS được đặt trong ống miễn dịch được phủ MSLN, sau đó phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại dung dịch đệm phong bế ra khỏi ống miễn dịch, và sau đó, thực khuẩn thể vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được xử lý trong ống và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, rửa sản phẩm thu được bằng 5 mL PBST 4 lần. Ống miễn dịch được xử lý bằng 1 mL dung dịch đệm rửa giải Glyxin (pH 2,0), và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để thu dịch nổi. Sau khi rửa giải, 100 µL Tris-Cl 1,5M (pH 8,8) được bổ sung vào thực khuẩn thể và được trung hòa. 10 mL vi khuẩn XL1-blue (tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene)

được nuôi cấy trong khoảng 2 giờ ($OD_{600} = 0,8$ đến $1,0$) được xử lý với thực khuẩn thể đã được trung hòa. Sau khi gây nhiễm ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, 10 mL SB, 20 μ L tetracyclin (50 mg/ml), và 10 μ L carbenixilin (100 mg/mL) được bổ sung vào 10 mL vi khuẩn XL1-Blue đã được gây nhiễm (tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), và nuôi cấy kèm lắc (200vòng/phút) ở 37°C trong 1 giờ. Vi khuẩn được xử lý với 1 mL thực khuẩn thể hỗ trợ VCSM13 ($> 10^{11}$ pfu/ml), và nuôi cấy kèm lắc (200 vòng/phút) ở 37°C trong 1 giờ. Sau 1 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được xử lý với 80 mL SB, 100 μ L kanamycin, và 100 μ L carbenixilin (100 mg/mL), và được nuôi cấy qua đêm (200 vòng/phút) ở 37°C . Thư viện được nuôi cấy qua đêm được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút để chỉ tách dịch nổi, và PEG/NaCl 5X được dùng để bổ sung PEG/NaCl 1X vào dịch nổi, và sản phẩm thu được được để tĩnh trên nước đá trong 30 phút. Dịch nổi được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 30 phút, và viên cặn được tạo huyền phù lại với 2mL BSA 1%/PBS và ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, chỉ lấy dịch nổi và sử dụng trong bước sàng lọc theo thứ tự sau đây. Quy trình này được lặp lại 4 lần.

3-5: Chon lọc kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng

Dịch nổi được loại bỏ bằng 50 μ L vi hạt streptavidin (Miltenyl biotec 130-048-101), và 1 mL PBS được bổ sung vào đó để thực hiện việc rửa ba lần. 1 mL PBS chứa BSA 1% được bổ sung vào hạt, và hạt được quay ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, sau đó phong bế. 50 nM MSLN được đặt trong 500 μ L PBS, và được trộn với 500 μ L thực khuẩn thể thư viện hữu tỷ VH của MS502 và cho phản ứng quay ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch đệm phong bế được loại ra khỏi hạt, và hạt được xử lý bằng dung dịch chứa MSLN và thực khuẩn thể, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Sau đó, rửa sản phẩm thu được bằng 1 mL PBST sáu lần. Hạt được xử lý bằng 1 mL dung dịch đệm rửa giải Glyxin (pH 2,0), và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để thu dịch nổi. Sau khi rửa giải, 100 μ L Tris-Cl

1,5M (pH 8,8) được bổ sung vào thực khuẩn thể và được trung hòa. 10 mL vi khuẩn XL1-blue (tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene) được nuôi cấy trong khoảng 2 đến 2,5 giờ ($OD_{600} = 0,8$ đến $1,0$) được xử lý với thực khuẩn thể đã được trung hòa. Sau khi gây nhiễm ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, 10 mL SB, 20 μ L tetracyclin (50 mg/ml), và 10 μ L carbenixilin (100 mg/mL) được bổ sung vào 10 mL vi khuẩn XL1-Blue đã được gây nhiễm (tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), và nuôi cấy kèm lắc (200vòng/phút) ở 37°C trong 1 giờ. Vi khuẩn được xử lý với 1 mL thực khuẩn thể hỗ trợ VCSM13 ($> 10^{11}$ pfu/ml), và nuôi cấy huyền phù (200 vòng/phút) ở 37°C trong 1 giờ. Sau 1 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được xử lý với 80 mL SB, 100 μ L kanamycin, và 100 μ L carbenixilin (100 mg/mL), và được nuôi cấy qua đêm (200 vòng/phút) ở 37°C . Thư viện được nuôi cấy qua đêm được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút để chỉ tách dịch nổi, và dung dịch đệm PEG/NaCl 5X được dùng để bổ sung PEG/NaCl 1X vào dịch nổi, và sản phẩm thu được được để tĩnh trên nước đá trong 30 phút. Dịch nổi được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 30 phút, và viên cặn được tạo huyền phù lại với 2m BSA 1%/PBS và ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, chỉ lấy dịch nổi và sử dụng trong bước sàng lọc theo thứ tự sau đây. Tổng số lần sàng lọc hạt cấp một, cấp hai, cấp ba với MSLN được thực hiện bằng cách sử dụng thực khuẩn thể thư viện hữu tỷ V_H của MS502. Kết quả của bước sàng lọc cấp hai và cấp ba, xác nhận rằng độ chuẩn đầu ra tăng, chứng tỏ rằng các kháng thể kháng MSLN được khuếch đại.

3-6: Xác nhận chắc chắn các dòng riêng lẻ theo ELISA

Các khuẩn lạc đơn của quần thể được khuếch đại cuối cùng của mỗi thư viện của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/chuỗi nặng được thu gom, và nuôi cấy với 1,5 mL SB/carbenixilin đến khi giá trị OD_{600} bằng 0,8 đến 1,0 ở 37°C và ở 220 vòng/phút, và sau đó được nuôi cấy với 1 mM IPTG ở 30°C và ở 200 vòng/phút trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các vật liệu phản ứng được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 5 phút, và

chỉ mỗi dịch nổi được bổ sung vào đĩa ELISA chứa kháng nguyên MSLN ở dưới, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, vật liệu thu được được rửa bằng PBST (1XPBS, Tween 20 0,05%) 4 lần, và HRP/Liên hợp kháng hFab-HRP được pha loãng theo tỷ lệ 1/5000 với BSA 1%/1XPBS được bổ sung vào đó, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và được rửa bằng PBST (1XPBS, Tween 20 0,05%) 4 lần. Sau đó, dung dịch TMB được bổ sung và để tĩnh trong 5 đến 10 phút, và dung dịch dừng TMB được bổ sung vào đó. Tiếp theo, giá trị O.D. được đo ở bước sóng đo là 450 nm sử dụng ánh sáng TECAN, và các dòng có giá trị O.D. cao được xác nhận chắc chắn là dòng riêng lẻ.

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 11, các dòng liên kết đặc hiệu với MSLN của người có thể được chọn lọc, và trình tự axit amin của chúng được xác định.

Bảng 12 thể hiện trình tự axit amin CDR của các kháng thể dòng trên Bảng 11 trên cơ sở đánh số Kabat.

【Bảng 11】

Dòng	Vùng biến đổi	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
C2G1	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPSGSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLLTVSS	48
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGPNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLSGYVFGG GTKVTVLG	109
C2G4	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPSGSKYYADSVR	48

		GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLVTVSS	
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDPSLNGYVFG GGTKVTVLG	110
C3C8	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPDSGSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLVTVSS	48
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGPNAVS WYQQLPGTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSDLRGYVFG GGTKVTVLG	111
54	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIYPDSSSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR NIYTFDYWGQGTLVTVSS	112
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFG GGTKVTVLG	49
56	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPDSASKYYADSVR GRFTVSRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLVTVSS	113
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS	49

		WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFG GGTKVTVLG	
2-30	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPDSNSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMRTFDYWGQGTLVTVSS	114
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFG GGTKVTVLG	49
2-73	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPNSDSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLVTVSS	115
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGPPGQRVTISCTGSSSNIGNNSVS WYQQLPGTAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAIGGLRSEDEADYYCGAWDDSLNAYVFG GGTKLTVLG	49
2-78	chuỗi nặng	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPDSGSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMFSFDYWGQGTLVTVSS	116
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDSSLNGYVFG GGTKVTVLG	49

【Bảng 12】

Dòng	Vùng biến đổi	CDR1	CDR2	CDR3
C2G1	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPD SGSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 65)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGPNA VS (SEQ ID NO: 117)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSL SGYV (SEQ ID NO: 118)
C2G4	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPD SGSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 65)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119)
C3C8	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPD SGSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 65)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGPNA VS (SEQ ID NO: 117)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSDLRGYV (SEQ ID NO: 120)
54	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDSSSKYYAD SVRG	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)

		59)	(SEQ ID NO: 121)	
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)
56	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDASKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 122)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)
2-30	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDNSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 123)	NMRTFDY (SEQ ID NO: 124)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)
2-73	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPNSDSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 125)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)
2-78	chuỗi	NYAMS	GIPPDSGSKYYAD	NMFSFDY

	nặng	(SEQ ID NO: 59)	SVRG (SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 126)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDSSLNGYV (SEQ ID NO: 69)

3-7: So sánh và chọn lọc tương đối theo lực liên kết của các dòng riêng lẻ sử dụng SPR

Để so sánh và đo lực liên kết với dịch nuôi cấy của các dòng riêng lẻ đã được xác nhận chắc chắn từ việc xác nhận các dòng riêng lẻ theo phương pháp ELISA được thực hiện trong Ví dụ 3-3, trước tiên, MSLN của người trên chip biacore dòng S CM5 (GE healthcare) được hòa tan trong dung dịch đệm axetat pH 4,0 thành 1 µg/ml, và để chảy ở tốc độ dòng là 10 µL/phút và được cố định lên 1000 Ru. Dịch nổi Fab được biểu hiện trong Ví dụ 3 đến 6 được pha loãng theo tỷ lệ 1/10 bằng dung dịch đệm HBS-EP pH 7,4, và được để chảy ở tốc độ dòng là 30 µL/phút để liên hợp trong 120 giây, và phân ly trong 180 giây để thực hiện phân tích liên kết. Thực hiện quá trình hồi phục bằng dung dịch đệm Glyxin-HCl 10 mM pH 1,5 trong 30 giây. Dữ liệu ELISA và liên kết SPR được so sánh và phân tích để chọn lọc dòng cuối cùng của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nặng.

Kết quả là, như được minh họa trên FIG.2 và 3, lực liên kết của các đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và các đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng được so sánh tương đối, và C2G1, C2G4, và C3C8 được chọn cho các dòng cuối cùng của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và 56, 2-30, 2-58, 2-73, và 2-78 được chọn cho các dòng cuối cùng của vùng biến đổi của chuỗi nặng.

3-8: Tách dòng gen IgG của kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dòng MS502

Mỗi trong số các gen C2G1, C2G4, và C3C8 vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được xác nhận chắc chắn được đưa vào PCR bằng cách sử dụng ADN polymeraza PrimeSTAR HS (Cat.No.R010B; Takara) và mỗi xuôi chứa NotI (Bảng 6: SEQ ID NO: 86) và mỗi ngược (Bảng 6: SEQ ID NO: 87). Ngoài ra, vùng hằng định của chuỗi nhẹ kappa của kháng thể người được đưa vào PCR với mỗi xuôi (Bảng 6: SEQ ID NO: 88) và mỗi ngược (Bảng 6: SEQ ID NO: 89). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của chuỗi nhẹ tương ứng được trộn, sau đó tiến hành PCR gộp chồng, sao cho các gen biểu hiện vùng chuỗi nhẹ được tách dòng. PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 94°C trong 10 phút, và sau đó đặt ở 94°C trong 15 giây, ở 56°C trong 30 giây, và ở 72°C trong 90 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, các gen tách được được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn NotI, HindIII ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Vector plasmit pcIW cũng được cắt bằng phương pháp tương tự như trên và được tách trên gel agarosa. Các gen vùng chuỗi nhẹ C2G1, C2G4, và C3C8 tách được được chèn vào vị trí NotI, HindIII của vector pcIW mạch thẳng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (Cat.No.M0203S, New England BioLabs (NEB)). Vật liệu của phản ứng nối được biến nạp vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), được cấy trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraiBiotech) chứa carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy, và plasmit được tách bằng cách sử dụng kit

plasmid mini (Cat.No.27405, QIAGEN), và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

3-9: Tách dòng gen IgG của kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng dòng MS502

Mỗi trong số các gen vùng biến đổi của chuỗi nặng 56, 2-30, 2-58, 2-73, và 2-78 làm khuôn được đưa vào PCR bằng cách sử dụng ADN polymeraza PrimeSTAR HS (Cat.No.R010B; Takara) và mỗi xuôi chứa NotI (Bảng 6: SEQ ID NO: 90) và mỗi ngược chứa ApaI (Bảng 6: SEQ ID NO: 91). PCR được thực hiện bằng cách lặp lại việc đặt ở nhiệt độ 98°C trong 2 phút, và sau đó đặt ở 98°C trong 10 giây, ở 58°C trong 10 giây, và ở 72°C trong 30 giây 30 lần, và cho phản ứng ở 72°C trong 5 phút. Trong các gen được khuếch đại, các băng ADN có kích thước mong muốn được xác nhận trên gel agarosa 1%, và lần lượt được tách bằng cách sử dụng kit tách trên gel. Sau đó, ba loại gen được tách được cho bản ứng với enzym cắt giới hạn KpnI và ApaI ở 37°C trong 4 giờ. Các gen được cho phản ứng với enzym cắt giới hạn được tách trên gel agarosa 1% lần nữa. Vector plasmid pclW cũng được cắt bằng phương pháp tương tự như trên và được tách trên gel agarosa. Các gen tách được được chèn vào vị trí NotI, ApaI của vector pclw mạch thẳng chứa vùng hằng định chuỗi nặng của người bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Vật liệu của phản ứng nối được biến nạp vào vi khuẩn XL1-Blue (Tế bào có khả năng điện biến nạp; Cat.No.200228, Stratagene), được cấy trải trên đĩa LB (Cat.No.LN004CA, NaraeBiotech) chứa carbenixilin, và nuôi cấy ở 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Các khuẩn lạc đơn được chọn và nuôi cấy, và plasmid được tách bằng cách sử dụng kit plasmid mini (Cat.No.27405, QIAGEN), và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

3-10: Sản xuất và tinh sạch IgG của kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dòng MS502

Để sản xuất và tinh sạch các kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ C2G1, C2G4, và C3C8, tế bào Expi293F™ được chủng ngừa ở nồng độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Sau khi ủ (37°C , 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 24 giờ, môi trường biểu hiện Expi293™ (Cat.No.A1435101, Gibco) được bổ sung để điều chế 30mL sản phẩm có nồng độ là $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL (khả năng sống = 95%). 30 μg ADN (vùng biến đổi chuỗi nặng pcIw-MS502: 15 μg , thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ pcIw-kháng-Mesothelin: 15 μg) được pha loãng trong môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) để có tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. 1,5 mL môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) được trộn với 80 μL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) để tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau khi phản ứng trong 5 phút, 1,5 mL ADN được pha loãng và 1,5 mL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được pha loãng được trộn đều với nhau, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 đến 30 phút. 3 mL hỗn hợp ADN và chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được xử lý trong các tế bào Expi293F™. Sau khi nuôi cấy huyền phù (37°C , 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 16 đến 18 giờ, 150 μL chất tăng cường 1 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) và 1,5 mL chất tăng cường 2 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy huyền phù trong 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được cho qua bộ lọc cỡ 0,22 μm để được điều chế. MabSelect Xtra (Cat.No.17-5269-02, GE Healthcare) là nhựa protein A có 100 μL được điều chế cho mỗi 30 mL dịch nuôi cấy, sau đó ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại dung dịch bảo quản, và rửa sản phẩm thu được bằng 400 μL dung dịch đệm liên kết protein A (Cat.No.21007, Pierce) 3 lần. Nhựa protein A được bổ sung vào dịch nuôi cấy điều chế được và cho phản ứng quay ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp dịch nuôi cấy và nhựa được đặt vào cột quay đục lỗ nắp sập (Cat.No.69725,

Thermo), và sau đó, chỉ nhựa được để lại trong cột nhờ sử dụng ống phân phối chân không QIAvac 24 Plus (Cat.No.19413, QIAGEN). 5 mL dung dịch đệm liên kết protein A được bổ sung để rửa nhựa, và 200 μ L dung dịch đệm rửa giải protein A (Cat.No.21009, Pierce) được bổ sung vào đó. Vật liệu thu được được cho phản ứng bằng cách tạo huyền phù lại ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 1 phút, và rửa giải. Mỗi dịch rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung 2,5 μ L Tris-HCl 1,5M (pH 9,0). Tiến hành rửa giải 4 đến 6 lần, và định lượng mỗi phân đoạn bằng cách sử dụng Nanodrop 200C (Thermo scientific). Các phân đoạn trong đó protein được phát hiện được thu gom, và trao đổi với dung dịch đệm PBS (Phosphate-Buffered Saline) nhờ sử dụng cột loại muối Zeba Spin, 7K MWCO, 5 mL (Cat.No.0089892, Pierce). Sau đó, tiến hành điện di protein (SDS-PAGE) trong điều kiện khử và không khử để xác nhận lần cuối việc định lượng nồng độ và tình trạng kháng thể, và giữ kháng thể ở nhiệt độ 4°C.

3-11: Đo lực liên kết định lượng của kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ MS502 với kháng nguyên MSLN

Lực liên kết định lượng (ái lực) của kháng thể kháng MSLN tinh sạch, tức là, các kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dòng MS502 C2G1, C2G4, và C3C8 đối với mesothelin tái tổ hợp của người (MSLN) được đo bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học Biacore T-200 (GE Healthcare, Mỹ). MSLN (Cat.No.3265-MS, R&D systems, Mỹ) được tinh sạch từ tế bào HEK293 được cố định lên chip CM5 (GE Healthcare, CAT. No. BR-1005-30) để thỏa mãn 200 Rmax bằng cách sử dụng phản ứng amin-carboxylic. Sau đó, kháng thể dòng C2G1, kháng thể dòng C2G4 hoặc kháng thể dòng C3C8 được pha loãng tuần tự bằng dung dịch đệm HBS-EP (10mM HEPES, pH7,4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20) được để chảy ở khoảng nồng độ 0,078 nM đến 5 nM và ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút để liên hợp trong 120 giây và phân ly trong 1800 giây. Sự phân ly của kháng thể được liên kết với MSLN được gây ra bằng cách cho chảy Glyxin-HCl 10 mM pH 1,5 ở tốc độ

dòng là 30 μL /phút trong 30 giây (Bảng 13). Ái lực thu được dưới dạng hằng số tốc độ chuyển động (K_{on} và K_{off}) và hằng số phân ly cân bằng (K_D) bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T-200 (Bảng 14).

【Bảng 13】

SPR	Biacore T200
Chip	CM5
Dung dịch đệm chạy	HBS-EP pH7,4
Tốc độ dòng	30 μL /phút
Thời gian liên hợp/phân ly	120 giây / 600 giây
Nồng độ IgG	0,078~5nM, 1/2 độ pha loãng tuần tự
Phục hồi	10mM Glyxin-HCl pH1,5, 30 giây

【Bảng 14】

	K_{on}	K_{off}	K_D
C2G1	$7,20 \times 10^7$	$6,76 \times 10^{-3}$	$9,39 \times 10^{-11}$
C2G4	$1,40 \times 10^8$	$6,05 \times 10^{-3}$	$4,32 \times 10^{-11}$
C3C8	$5,84 \times 10^7$	$7,11 \times 10^{-3}$	$1,22 \times 10^{-10}$

3-12: Sản xuất và tinh sạch IgG của kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng dòng MS502

Để sản xuất và tinh sạch kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng 56, 2-30, 2-58, 2-73, 2-78, tế bào Expi293F™ được chủng ở nồng độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Sau khi ủ (37°C, 8% CO_2 , 125 vòng/phút) trong 24 giờ, môi trường biểu hiện Expi293™ (Cat.No.A1435101, Gibco) được bổ sung để điều chế 30mL sản phẩm có nồng độ là $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL (khả năng sống = 95%). 30 μg ADN (đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng pcIw-MS502: 15 μg , vùng biến đổi của chuỗi nhẹ pcIw-MS502: 15 μg) được pha loãng trong môi trường SEM OptiPro™

(Cat.No.12309019, Gibco) để có tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. 1,5 mL môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) được trộn với 80 µL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) để tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau khi phản ứng trong 5 phút, 1,5 mL ADN được pha loãng và 1,5 mL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được pha loãng được trộn đều với nhau, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 đến 30 phút. 3 mL hỗn hợp ADN và chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được xử lý trong các tế bào Expi293F™. Sau khi nuôi cấy huyền phù (37 °C, 8% CO₂, 125 vòng/phút) trong 16 đến 18 giờ, 150 µL chất tăng cường 1 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) và 1,5 mL chất tăng cường 2 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy huyền phù trong 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 4000vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được cho qua bộ lọc cỡ 0,22µm để được điều chế. MabSelect Xtra (Cat.No.17-5269-02, GE Healthcare) là nhựa protein A có 100 µL được điều chế cho mỗi 30 mL dịch nuôi cấy, sau đó ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại dung dịch bảo quản, và rửa sản phẩm thu được bằng 400 µL dung dịch đệm liên kết protein A (Cat.No.21007, Pierce) 3 lần. Nhựa protein A được bổ sung vào dịch nuôi cấy điều chế được và cho phản ứng quay ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp dịch nuôi cấy và nhựa được đặt vào cột quay đục lỗ nắp sập (Cat.No.69725, Thermo), và sau đó, chỉ nhựa được để lại trong cột nhờ sử dụng ống phân phối chân không QIAvac 24 Plus (Cat.No.19413, QIAGEN). 5 mL dung dịch đệm liên kết protein A được bổ sung để rửa nhựa, 200 µL dung dịch đệm rửa giải protein A (Cat.No.21009, Pierce) được bổ sung vào đó. Vật liệu thu được được cho phản ứng bằng cách tạo huyền phù lại ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 1 phút, và rửa giải. Mỗi dịch rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung 2,5 µL Tris-HCl 1,5M (pH 9.0). Tiến hành rửa giải 4 đến 6 lần, và định lượng mỗi phân đoạn bằng cách sử dụng Nanodrop 200C

(Thermo scientific). Các phân đoạn trong đó protein được phát hiện được thu gom, và trao đổi với dung dịch đệm PBS (Phosphate-Buffered Saline) nhờ sử dụng cột loại muối Zeba Spin, 7K MWCO, 5 mL (Cat.No.0089892, Pierce). Sau đó, tiến hành điện di protein (SDS-PAGE) trong điều kiện khử và không khử để xác nhận lần cuối việc định lượng nồng độ và tình trạng kháng thể, và giữ kháng thể ở nhiệt độ 4°C.

3-13: Sản xuất và tinh sạch IgG của kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng được kết hợp với dòng C2G4 đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cuối cùng của dòng MS502

Dòng C2G4 có giá trị tốt nhất trong phép đo ái lực trong số các đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn và cố định làm dòng cuối cùng của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Sau đó, để kết hợp, sản xuất và tinh sạch kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng 56, 2-30, 2-58, 2-73, và 2-78, tế bào Expi293F™ được chủng ở nồng độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Sau khi ủ (37°C, 8% CO₂, 125 vòng/phút) trong 24 giờ, môi trường biểu hiện Expi293™ (Cat.No.A1435101, Gibco) được bổ sung để điều chế 30mL sản phẩm có nồng độ là $2,5 \times 10^6$ tế bào/mL (khả năng sống = 95%). 30 µg ADN (kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng pcIw-MS502: 15 µg, C2G4 đột biến vùng biến đổi của chuỗi nhẹ pcIw: 15 µg) được pha loãng trong môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) để có tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. 1,5 mL môi trường SEM OptiPro™ (Cat.No.12309019, Gibco) được trộn với 80 µL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) để tổng thể tích là 1,5 mL, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau khi phản ứng trong 5 phút, 1,5 mL ADN được pha loãng và 1,5 mL chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được pha loãng được trộn đều với nhau, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 đến 30 phút. 3 mL hỗn hợp ADN và chất phản ứng ExpiFectamine™ 293 được xử lý trong các tế bào Expi293F™. Sau khi nuôi cấy

huyền phù (37 °C, 8% CO₂, 125 vòng/phút) trong 16 đến 18 giờ, 150 µL chất tăng cường 1 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) và 1,5 mL chất tăng cường 2 ExpiFectamine™ 293 (Cat.No.A14524, Gibco) được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy huyền phù trong 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 4000vòng/phút trong 20 phút, và dịch nổi được cho qua bộ lọc cỡ 0,22µm để được điều chế. MabSelect Xtra (Cat.No.17-5269-02, GE Healthcare) là nhựa protein A có 100 µL được điều chế cho mỗi 30 mL dịch nuôi cấy, sau đó ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại dung dịch bảo quản, và rửa sản phẩm thu được bằng 400 µL dung dịch đệm liên kết protein A (Cat.No.21007, Pierce) 3 lần. Nhựa protein A được bổ sung vào dịch nuôi cấy điều chế được và cho phản ứng quay ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp dịch nuôi cấy và nhựa được đặt vào cột quay đục lỗ nắp sập (Cat.No.69725, Thermo), và sau đó, chỉ nhựa được để lại trong cột nhờ sử dụng ống phân phối chân không QIAvac 24 Plus (Cat.No.19413, QIAGEN). 5 mL dung dịch đệm liên kết protein A được bổ sung để rửa nhựa, 200 µL dung dịch đệm rửa giải protein A (Cat.No.21009, Pierce) được bổ sung vào đó. Vật liệu thu được được cho phản ứng bằng cách tạo huyền phù lại ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 1 phút, và rửa giải. Mỗi dịch rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung 2,5 µL Tris-HCl 1,5M (pH 9.0). Tiến hành rửa giải 4 đến 6 lần, và định lượng mỗi phân đoạn bằng cách sử dụng Nanodrop 200C (Thermo scientific). Các phân đoạn trong đó protein được phát hiện được thu gom, và trao đổi với dung dịch đệm PBS (Phosphate-Buffered Saline) nhờ sử dụng cột loại muối Zeba Spin, 7K MWCO, 5 mL (Cat.No.0089892, Pierce). Sau đó, tiến hành điện di protein (SDS-PAGE) trong điều kiện khử và không khử để xác nhận lần cuối việc định lượng nồng độ và tình trạng kháng thể, và giữ kháng thể ở nhiệt độ 4°C.

【Bảng 15】

Dòng	Vùng	trình tự axit amin	SEQ ID NO:
------	------	--------------------	------------

	biến đổi		
56-C2G4	chuỗi nặng	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPDASKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLVTVSS	113
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDPSLNGYVF GGGTKVTVLG	110
2-30- C2G4	chuỗi nặng	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPDNSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMRTFDYWGQGTLVTVSS	114
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDPSLNGYVF GGGTKVTVLG	110
2-73- C2G4	chuỗi nặng	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPNSDSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMLSFDYWGQGTLVTVSS	115
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDPSLNGYVF GGGTKVTVLG	110
2-78-	chuỗi	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA	116

C2G4	nặng	MSWVRQAPGKGLEWVSGIPPDSGSKYYADSVR GRFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KNMFSFDYWGQGTLVTVSS	
	chuỗi nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGSNAVS WYQQLPGTAPKLLIYYNSKRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDPSLNGYVF GGGTKVTVLG	110

【Bảng 16】

Dòng	Vùng biến đổi	CDR1	CDR2	CDR3
56- C2G4	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDASKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 122)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119)
2-30- C2G4	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDNSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 123)	NMRTFDY (SEQ ID NO: 124)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 120)
2-73- C2G4	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPNSDSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 123)	NMLSFDY (SEQ ID NO: 66)

		59)	(SEQ ID NO: 125)	
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119)
2-78- C2G4	chuỗi nặng	NYAMS (SEQ ID NO: 59)	GIPPDSGSKYYAD SVRG (SEQ ID NO: 65)	NMFSFDY (SEQ ID NO: 126)
	chuỗi nhẹ	TGSSSNIGSNA VS (SEQ ID NO: 67)	YNSKRPS (SEQ ID NO: 68)	GSWDPSLNGYV (SEQ ID NO: 119)

3-14: Đo lực liên kết định lượng của kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng MS502 và tổ hợp C2G4 và kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng đối với kháng nguyên MSLN

Lực liên kết định lượng (ái lực) của mỗi trong số kháng thể kháng MSLN tinh sạch, tức là, kháng thể đột biến vùng biến đổi chuỗi nặng dòng MS502 56, 2-30, 2-73, 2-78, và các kháng thể tổ hợp của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ C2G4 và kháng thể đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm 56-C2G4, 2-30-C2G4, 2-73-C2G4, 2-78-C2G4 với mesothelin tái tổ hợp của người (MSLN) được đo bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học Biacore T-200 (GE Healthcare, Mỹ). MSLN (Cat.No.3265-MS, R&D systems, Mỹ) được tinh sạch từ tế bào HEK293 được cố định lên chip CM5 (GE Healthcare, CAT. No. BR-1005-30) để thỏa mãn 200 Rmax bằng cách sử dụng phản ứng amin-carboxylic. Sau đó, kháng thể dòng 56, kháng thể dòng 2-30, kháng thể dòng 2-73, kháng thể dòng 2-78, kháng thể dòng 56-C2G4, kháng thể dòng 2-30-C2G4, kháng thể dòng 2-73-C2G4, và kháng thể dòng 2-78-C2G4 được pha loãng

tuần tự bằng dung dịch đệm HBS-EP (10mM HEPES, pH7,4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20) được để chảy ở khoảng nồng độ từ 0,078 nM đến 5 nM và ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút để liên hợp trong 120 giây và phân ly trong 1800 giây. Sự phân ly của kháng thể được liên kết với MSLN được gây ra bằng cách cho chảy Glyxin-HCl 10 mM pH 1,5 ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút trong 30 giây (Bảng 17). Ái lực thu được dưới dạng hằng số tốc độ chuyển động (K_{on} và K_{off}) và hằng số phân ly cân bằng (K_D) bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T-200 (Bảng 18).

【Bảng 17】

SPR	Biacore T200
Chip	CM5
Dung dịch đệm chạy	HBS-EP pH7,4
Tốc độ dòng	30 μ L/phút
Thời gian liên hợp/phân ly	120 giây / 600 giây
Nồng độ IgG	0,078~5nM, 1/2 độ pha loãng tuần tự
Phục hồi	10mM Glyxin-HCl pH1,5, 30 giây

【Bảng 18】

	K_{on}	K_{off}	K_D
56	$1,26 \times 10^7$	$1,57 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-10}$
2-30	$1,92 \times 10^8$	$3,19 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-10}$
2-78	$1,50 \times 10^8$	$2,44 \times 10^{-3}$	$1,63 \times 10^{-11}$
56 - C2G4	$6,61 \times 10^7$	$1,08 \times 10^{-2}$	$1,63 \times 10^{-10}$
2-30 - C2G4	$1,15 \times 10^8$	$2,70 \times 10^{-2}$	$2,34 \times 10^{-10}$
2-73 - C2G4	$8,98 \times 10^7$	$1,48 \times 10^{-2}$	$1,65 \times 10^{-10}$

2-78 - C2G4	$2,10 \times 10^8$	$7,82 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-11}$
-------------	--------------------	-----------------------	------------------------

Ví dụ 4: Phân tích FACS kháng thể kháng MSLN liên kết với tế bào ung thư biểu hiện MSLN

Để đánh giá xem kháng thể kháng MSLN có nguồn gốc từ thư viện miễn dịch và tổng hợp có liên kết chọn lọc với tế bào biểu hiện MSLN hay không, mức biểu hiện của MSLN được đo ở dòng tế bào ung thư, và kháng thể liên kết với mỗi tế bào được xác nhận bằng thử nghiệm FACS.

4-1: Tạo cấu trúc dòng tế bào biểu hiện MSLN

Plasmid (pCMV/MSLN) chứa đơn vị biểu hiện MSLN và gen kháng hygromycin được đưa vào tế bào ung thư tụy MiaPaCa-2 được xác nhận là dòng tế bào âm tính MSLN, bằng cách sử dụng hệ chuyển nhiễm jetPEI(polyetylenimin) (Polyplus, 101-40) (FIG.4). Sau 48 giờ, dịch nuôi cấy tế bào được thay bằng dịch nuôi cấy chứa hygromycin B (200 $\mu\text{g/mL}$). 10 khuẩn lạc có tính kháng với hygromycin thu được trong khi thay dịch nuôi cấy mỗi 3 ngày, để xác nhận mỗi mức biểu hiện của MSLN bằng phương pháp thấm tách Western. Với 4 loại dòng tế bào ung thư tụy (MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, AsPC-1) và hai loại dòng tế bào khối u trung biểu mô (H28, H2452), mức biểu hiện của MSLN ở tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng MSLN (# 133489, Abcam) thông qua phương pháp thấm tách Western. Dòng tế bào nuôi cấy được tách bằng cách bổ sung dung dịch Tryple Express và được bảo quản trong ống 15 mL, sau đó ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 3 phút để gạn dịch nuôi cấy, và sản phẩm thu được được tạo huyền phù với 100 μL dung dịch đệm mẫu SDS-PAGE 1x (50mM Tris(pH6,8), 2% SDS, 100mM DTT (dithiothreitol), 0,1% BPB (xanh bromophenol), 10% glyxerol) và được gia nhiệt trong 5 phút. Sản phẩm thu được được ly tâm để thu dịch nổi, sau đó điện di trong SDS-PAGE 4-12%, ở 20 mA trong khoảng 2 giờ, và đơn vị vận chuyển được sử dụng để chuyển protein tách được đến màng PVDF, và sau đó,

tiến hành điện di ở 300mA với dung dịch đệm tris-Glyxin (39mM Glyxin, 48mM tris, 0,037% SDS, 20% metanol) trong khoảng 90 phút. Màng PVDF trong đó protein được chuyển được đưa vào phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ bằng cách sử dụng dung dịch phong bế TBS. Kháng thể kháng MSLN (# 133489, Abcam) làm kháng thể sơ cấp được pha loãng theo tỷ lệ 1:2.000 với sữa tách kem 5%/dung dịch đệm TBST 1x, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ, và được rửa bằng dung dịch đệm TBST 1x 6 lần mỗi 5 phút. HRP kháng chuột (KPL, MA, Mỹ) làm kháng thể thứ cấp được pha loãng theo tỷ lệ 1:20.000 bằng sữa tách kem 5% / dung dịch đệm TBST 1x, và cho phản ứng trong 30 phút, và được rửa bằng dung dịch đệm TBST 1x 6 lần mỗi 5 phút. Sau đó, băng protein MSLN được xác nhận bằng dung dịch phản ứng hiện màu (ECL, Amersham, ANH).

Kết quả là, như được minh họa trên FIG.5, xác nhận rằng các dòng tế bào H28, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1 âm tính với MSLN, và H226, H2452(H2052), AsPC-1 dương tính với MSLN bằng cách đo xem có MSLN có dạng tiền chất kích thước 70kDa và dạng thành thực kích thước 40 đến 50kDa từ mỗi dòng tế bào ung thư hay không.

4-2: Phân tích mức biểu hiện của MSLN trong dòng tế bào biểu hiện MSLN và dòng tế bào khối u biểu hiện MSLN

Thử nghiệm FACS được thực hiện trên MSLN có mặt trong bề mặt tế bào với MiaPaCa-MSLN là dòng tế bào mà trong đó MSLN được biểu hiện theo cách nhân tạo. Tế bào cần phân tích được cho sinh trưởng trong đĩa nuôi cấy được tách bằng cách bổ sung dung dịch Tryple Express và bảo quản trong ống 50 mL, sau đó ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 3 phút để gạn dịch nuôi cấy, và sản phẩm thu được được rửa một lần bằng PBS. Tế bào được tạo huyền phù bằng dung dịch đệm FACS, và được chuyển vào ống đáy tròn và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 3 phút. Dịch nổi được loại bỏ và tế bào được

làm rời ra bằng dung dịch đệm FACS để có mật độ tế bào là $4 \times 10^5/\text{mL}$. Sau đó, 1 μg kháng thể ứng viên được bổ sung vào đó ở 4°C . Sau 1 giờ, vật liệu thu được được rửa bằng dung dịch đệm FACS hai lần, và kháng thể có nguồn gốc từ dê kháng IgG của người (liên hợp FITC) được bổ sung với lượng 1 μL cho mỗi mẫu để được liên hợp ở 4°C trong 30 phút. Thu tế bào bằng cách ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 3 phút, và 500 μL dung dịch đệm cố định được bổ sung để huyền phù lại tế bào, và tế bào được đo bằng caliber FACS (FIG.6).

4-3: Phân tích liên kết chọn lọc của kháng thể kháng MSLN với dòng tế bào biểu hiện MSLN

Thử nghiệm FACS được thực hiện để đánh giá xem kháng thể kháng MSLN có được liên kết chọn lọc với dòng tế bào biểu hiện quá mức MSLN (MiaPaCa-MSLN #2). Kháng thể kháng MSLN ứng viên được đánh dấu bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4-2 trên đây, và tế bào được đo bằng caliber FACS (FIG.7).

Tiến hành thử nghiệm FACS để đánh giá xem các kháng thể ứng viên MI323, MI329, MI403, và MS502 có lực liên kết tốt có được liên kết tốt ngay cả với dòng tế bào MSLN của khối u trung biểu mô (H226, H2052) và ung thư tụy (AsPC-1), và các kết quả được so sánh với giá trị MFI.

【Bảng 19】

MSLN Ab	Miapaca2	H226	ASPC-1	H2052
MSLN test	—	+	+	++
MS502	—	++	++	++
MI403	—	+	++	++
MI323	—	+++	++	++
MI329	—	+++	++	++
Morab	—	+++	++	++
BAY94-9343	—	+++	++	++

Kết quả là, như được thể hiện trên FIG.8 và Bảng 19, tất cả các kháng thể ứng viên MI323, MI329, MI403, và MS502 với MSLN của dòng tế bào khối u trung biểu mô và ung thư tụy có lực liên kết đáng kể mặc dù có sự chênh lệch một chút về mức độ liên kết. Cụ thể là, kháng thể ứng viên MI323 có đặc tính liên kết rất tốt.

Ngoài ra, dù kháng thể ứng viên MI323 có đặc tính liên kết rất tốt với MSLN hay không, kháng thể ứng viên MS502 có mẫu giá trị Biacore $K_D(K_{off}/K_{on})$ khác, và kháng thể ứng viên 2-78-C2G4 đột biến vùng biến đổi của chuỗi nặng được tạo ra từ kháng thể ứng viên MS502 được liên kết chọn lọc với tế bào khối u biểu hiện MSLN, được đánh giá ở tế bào MiaPaCa-MSLN #2 biểu hiện quá mức MSLN và MiaPaCa-2 không biểu hiện quá mức MSLN.

Kết quả là, như được minh họa trên FIG.9, các kháng thể ứng viên MI323, MS502, và 2-78-C2G4 có đặc tính liên kết rất tốt ở tế bào MiaPaCa-MSLN #2 biểu hiện quá mức MSLN so với MiaPaCa-2.

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Kháng thể liên kết đặc hiệu với mesothelin theo sáng chế có ái lực và tính đặc hiệu cao với kháng nguyên để có thể sử dụng một cách hiệu quả để điều trị hoặc chẩn đoán bệnh ung thư hoặc các bệnh u.

Sáng chế được mô tả chi tiết dựa trên các dấu hiệu cụ thể của nó, và hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng các phương pháp kỹ thuật cụ thể này chỉ là các phương án ưu tiên và do đó phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này. Do đó, phạm vi thực chất của sáng chế sẽ được xác định bằng yêu cầu bảo hộ kèm theo và các dạng tương đương của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể liên kết với mesothelin bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 109; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 116 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 116 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110.

2. Axit nucleic mã hóa kháng thể theo điểm 1.

3. Vector chứa axit nucleic theo điểm 2.

4. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 3.

5. Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm 1 bao gồm bước biểu hiện kháng thể bằng cách nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 4.

FIG.1

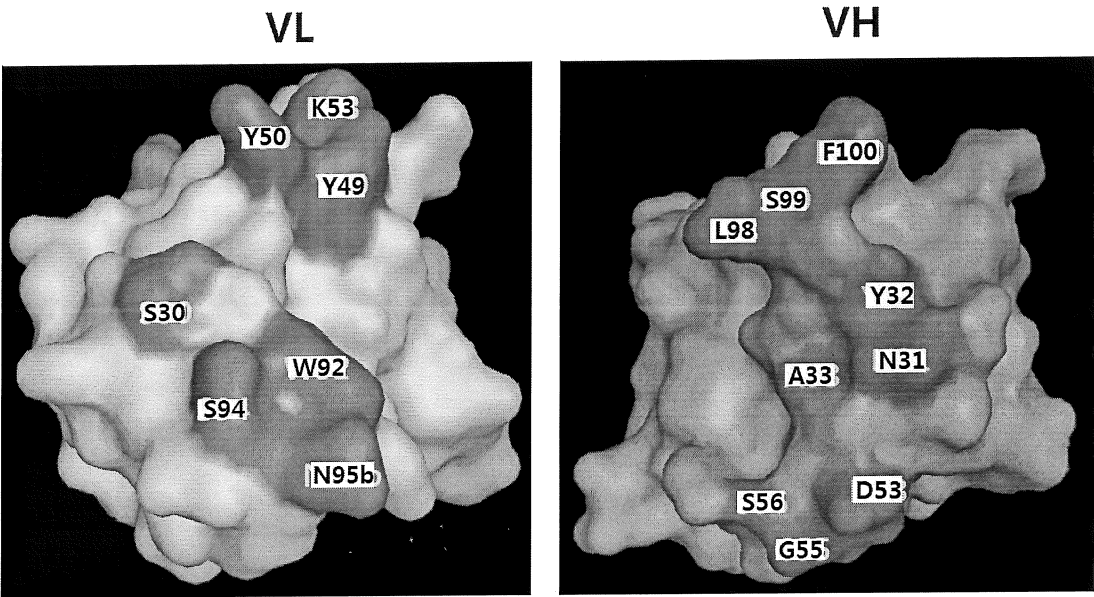
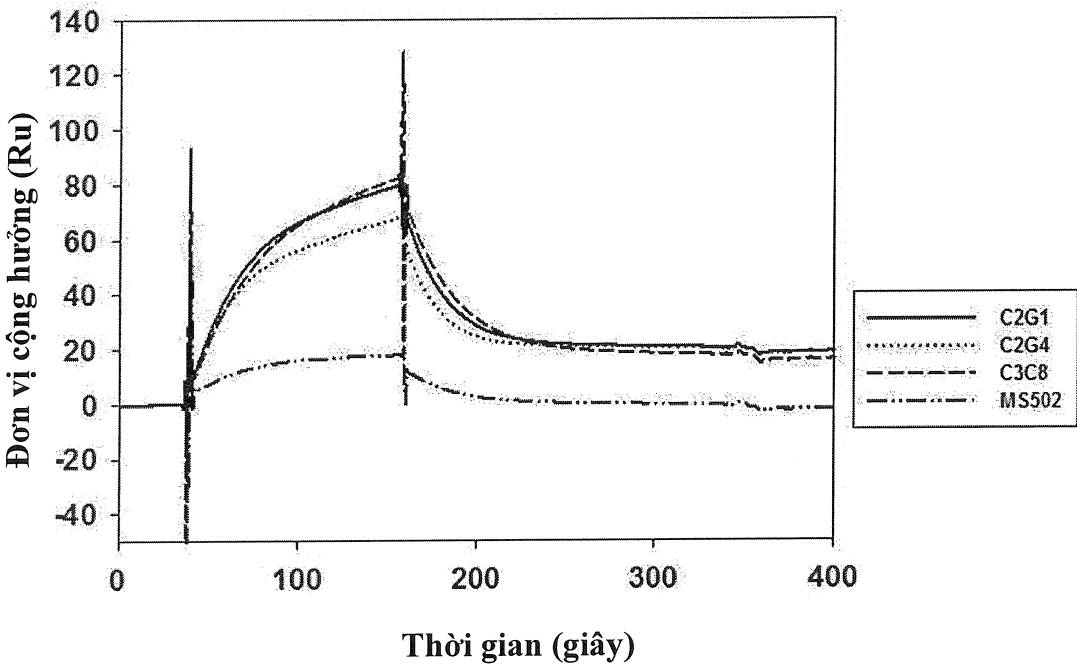


FIG.2



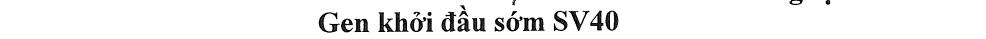


FIG.5

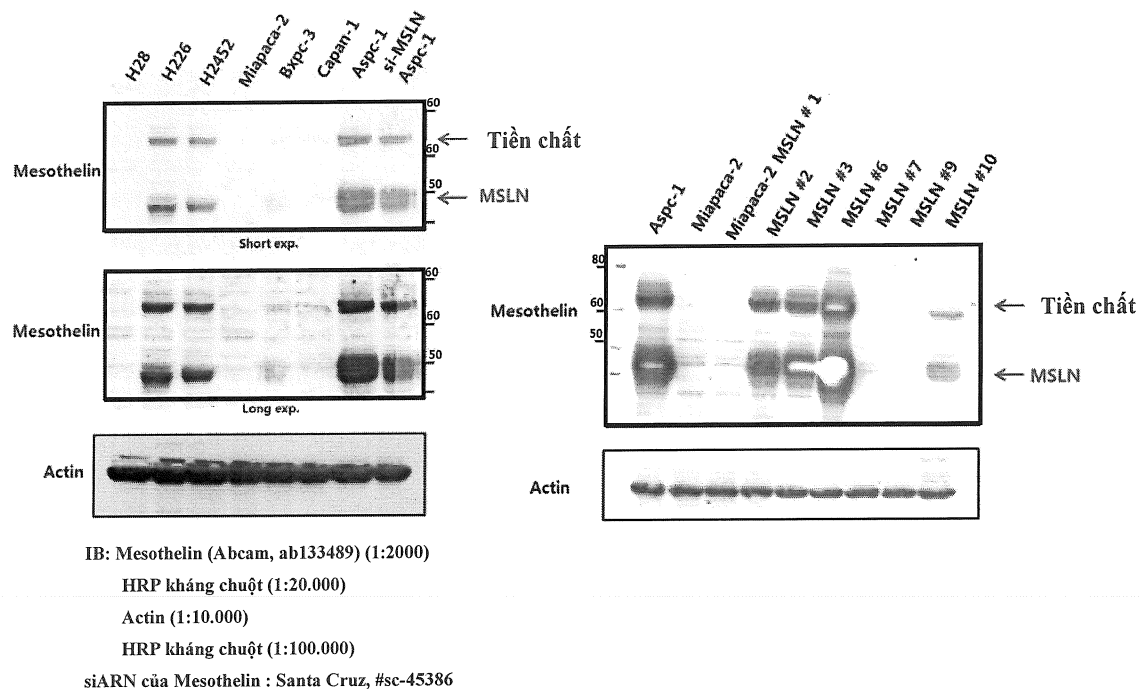


FIG.6

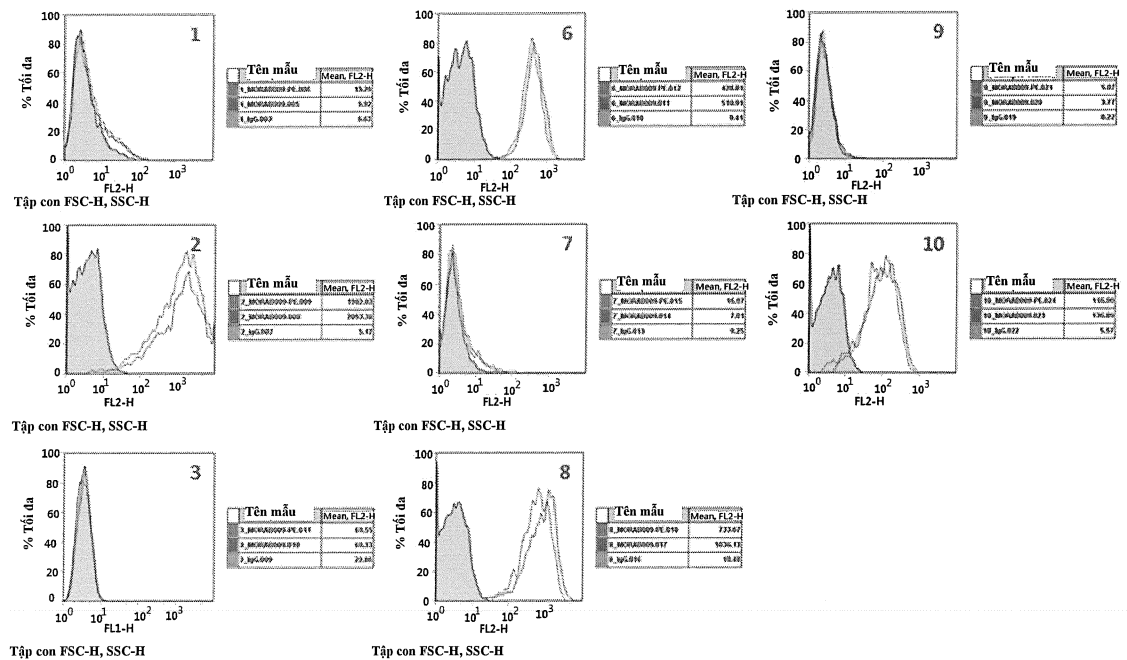
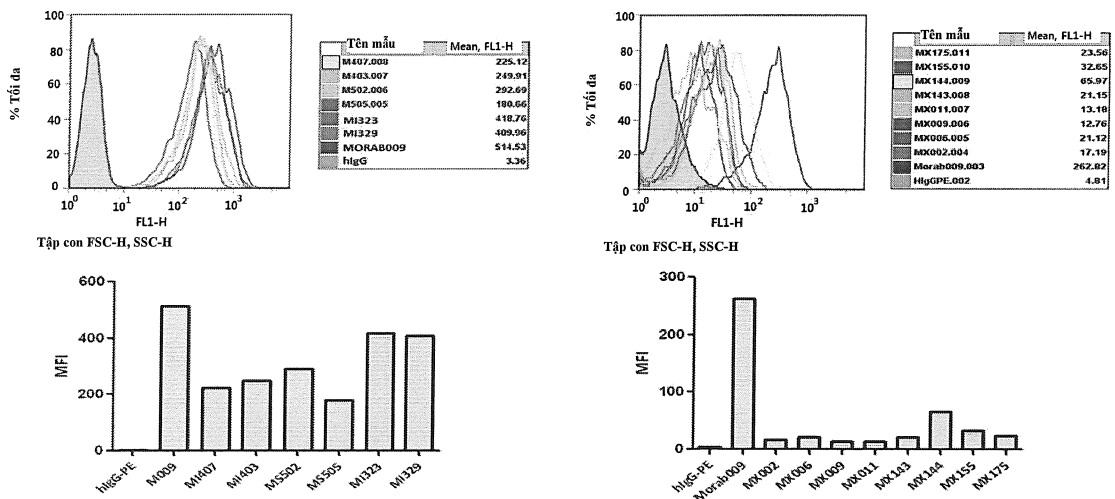


FIG.7



Dòng tế bào: dòng tế bào ổn định MSLN (#2)
 Kháng thể thứ nhất: IgG (thử nghiệm thứ nhất), 0,36µg (thử nghiệm thứ hai)
 Kháng thể thứ hai: FITC kháng thể kháng Fc của người (1µl/mẫu)

FIG.8

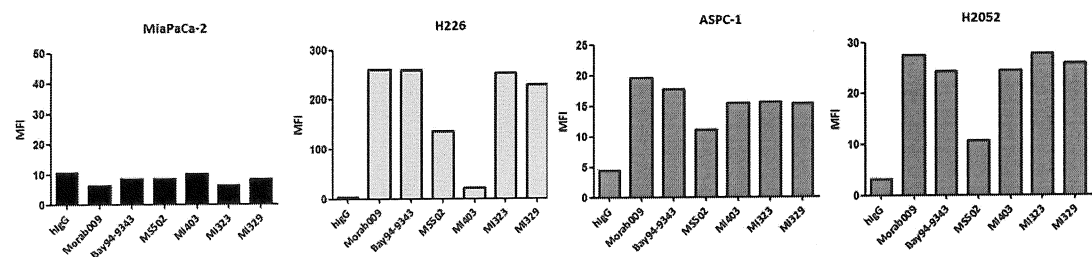
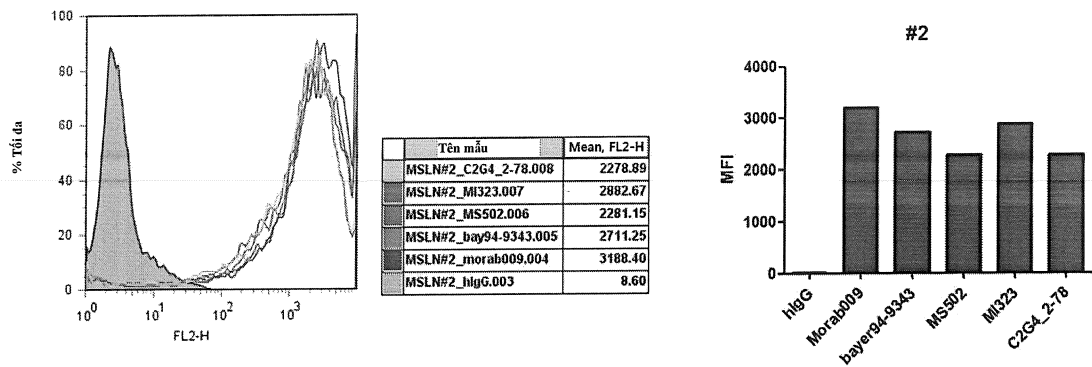
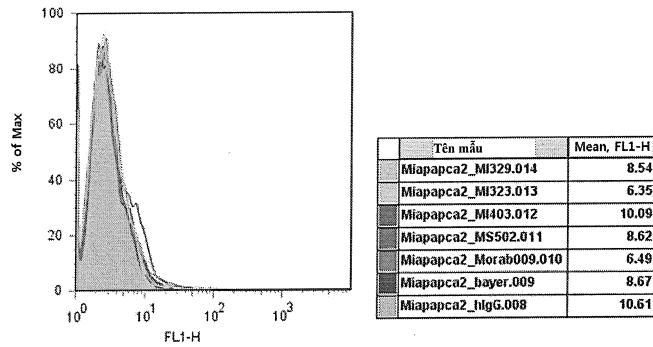


FIG.9



Tập con FSC-H, SSC-H



Tập con FSC-H, SSC-H

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MOGAM INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH
GREEN CROSS CORPORATION

<120> Kháng thể liên kết với mesothelin, phương pháp sản xuất kháng thể này

<130> PF-B2032

<140> PCT/KR2016/010604

<141> 2016-09-23

<150> 10-2015-0135755

<151> 2015-09-24

<160> 127

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI323_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI323_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 2

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

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_Chuồni nặng biến đổi

<400> 3

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

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 4

```

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

```

Arg

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 5

```

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

```

```

          100          105          110
Gly Ala Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
          115          120
<210>  6
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MI403_Chuỗi nhẹ biến đổi
<400>  6
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
          20           25           30
Ser Ser Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
          35           40           45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
          50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65           70           75           80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
          85           90           95
Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
<210>  7
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MI407_Chuỗi nặng biến đổi
<400>  7
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr
          20           25           30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

```

65						70						75						80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Phe	Cys			
					85						90						95	
Val	Arg	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Glu	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp			
					100						105						110	
Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
					115						120							

```
<210>      8
<211>      112
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      dòng MI407_Chuồni nhẹ biến đổi
<400>      8
```

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

```
<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MI323_CDR1 chuỗi nặng biến đổi
<400> 9
```

Ser	Tyr	Phe	Ile	Gln
1				5
<210>	10			
<211>	17			
<212>	PRT			

```

<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  dòng MI323_CDR2 chuỗi nặng biến đổi
<400>  10
Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Lys
1           5           10           15
Gly
<210>  11
<211>  10
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  dòng MI323_CDR3 chuỗi nặng biến đổi
<400>  11
Ser Gly Gly Tyr Gln Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1           5           10
<210>  12
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  dòng MI323_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi
<400>  12
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1           5           10
<210>  13
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  dòng MI323_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi
<400>  13
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Pro
1           5
<210>  14
<211>  9
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  dòng MI323_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

```

<400> 14

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_CDR1 chuỗi nặng biến đổi

<400> 15

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 16

Thr Ile Asn Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 17

Trp Gly Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 18

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 19

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI329_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 20

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_CDR1 chuỗi nặng biến đổi

<400> 21

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 22

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 23

Gln Gly Thr Ala Val Lys Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Val His

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 25

Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI403_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 26

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Phe Thr

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI407_CDR1 chuỗi nặng biến đổi

<400> 27

Asn Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI407_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 28

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI407_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 29

Gln Gly Thr Ser Val Glu Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MI407_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 30

Ser Val Ser Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile His

1 5 10

<210> 31

<211> 87

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MI323VH-F

<400> 31

gcggccgccca tgtacttggg actgaactat gtattcatag tttttctctt aaatggtgtc 60

cagagtgagg tccagctgca gcagtct 87

<210> 32

<211> 87
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI329VH-F
 <400> 32
 gcggccgccca tgtacttggg actgaactat gtattcatag tttttctctt aaatggtgtc 60
 cagagtgagg tgatgctggg ggagtct 87
 <210> 33
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI403VH-F
 <400> 33
 gcggccgccca tgtacttggg actgaactat gtattcatag tttttctctt aaatggtgtc 60
 cagagtgagg tgcaggtggg ggagtct 87
 <210> 34
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI407VH-F
 <400> 34
 gcggccgccca tgtacttggg actgaactat gtattcatag tttttctctt aaatggtgtc 60
 cagagtgagg tgaagttggg ggagtct 87
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> VHApaI-R
 <400> 35
 accgatgggc ccttgggtgga 20
 <210> 36
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI323VL-F

<400> 36
 gcggccgcca tggatagcca ggctcaggtg ctgatgctgc tgctgctgtg ggtgtcaggg 60
 acttgcgggg acattgtgat gacccagtct cacaaa 96
 <210> 37
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI323VLCL-R
 <400> 37
 aactaggag cgccacggt tcgtttgatt tccagtttg tccct 45
 <210> 38
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI329VL-F
 <400> 38
 gcggccgcca tggatagcca ggctcaggtg ctgatgctgc tgctgctgtg ggtgtcaggg 60
 acttgcgggg acgttgtgat gacccagact ccactc 96
 <210> 39
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI329VLCL-R
 <400> 39
 aactaggag cgccacggt tcgtttcagc tccagcttgg tc 42
 <210> 40
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI403VL-F
 <400> 40
 gcggccgcca tggatagcca ggctcaggtg ctgatgctgc tgctgctgtg ggtgtcaggg 60
 acttgcgggg atattgtgat gacccagtct cctgct 96
 <210> 41
 <211> 47
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MI403VLCL-R
 <400> 41
 acactaggag cggccacggt tcgtttttatt tccaactttg tccccga 47
 <210> 42
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> M407VL-F
 <400> 42
 gcggccgcca tggatagcca ggctcaggtg ctgatgctgc tgctgctgtg ggtgtcaggg 60
 acttgcgggg atattgtgtt gacacagtct cctgct 96
 <210> 43
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> M407VLCL-R
 <400> 43
 acactaggag cggccacggt tcgtttttatt tccaactctg tccccg 46
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Ck-F
 <400> 44
 accgtggcgg ctccctagtggt 20
 <210> 45
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CkSHB-R
 <400> 45
 nnnnggatcc aagcttacta gcaactcccc 29
 <210> 46
 <211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS501_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 46

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

<210> 47

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS501_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502_Chuồni nặng biến đổi

<400> 48

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

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

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

Ser Gly Ile Pro Pro Asp Ser Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asn Met Leu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502_Chuồni nhẹ biến đổi

<400> 49

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

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

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

Ile Tyr Tyr Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 50

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502-1_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 50

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ile Cys Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Tyr Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 51

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS503_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 51

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

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

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

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

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS503_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 52

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

<210> 53

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS504_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS504_Chuồni nhẹ biến đổi

<400> 54

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

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS505_Chuyển nặng biến đổi

<400> 55

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

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS505_Chuyển nhẹ biến đổi

<400> 56

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Tyr Asn Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 57

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS506_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 57

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Leu Tyr Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS506_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 58

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Ala Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Pro Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Ser Ser Leu

85 90 95
 Ser Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS501_CDR1 chuỗi nặng biến đổi
 <400> 59
 Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS501_CDR2 chuỗi nặng biến đổi
 <400> 60
 Gly Ile Tyr Pro Asp Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS501_CDR3 chuỗi nặng biến đổi
 <400> 61
 Asn Ile Tyr Thr Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 62
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS501_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi
 <400> 62
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala Val Ser
 1 5 10

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS501_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi
 <400> 63
 Tyr Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS501_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi
 <400> 64
 Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Tyr Val
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS502_CDR2 chuỗi nặng biến đổi
 <400> 65
 Gly Ile Pro Pro Asp Ser Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> dòng MS502_CDR3 chuỗi nặng biến đổi
 <400> 66
 Asn Met Leu Ser Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 67
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 67

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala Val Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 68

Tyr Asn Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 69

Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu Asn Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS502-1_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 70

Ile Cys Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala Val Ser

1 5 10

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS503_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 71

Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS503_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 72

Asn Ala Phe Thr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS503_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 73

Tyr Asn Ser His Arg Pro Ser

1 5

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS503_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 74

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS504_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 75

Ser Ile Tyr Pro Asn Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

```

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MS504_CDR3 chuỗi nặng biến đổi
<400> 76
Asn Leu Leu Thr Phe Asp Tyr
1          5
<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MS504_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi
<400> 77
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ser Val Ser
1          5          10
<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MS504_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi
<400> 78
Tyr Asp Ser His Arg Pro Ser
1          5
<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> dòng MS504_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi
<400> 79
Gly Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Ala Tyr Val
1          5          10
<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

<220>

<223> dòng MS505_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 80

Ala Ile Tyr Pro Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS505_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 81

Asn Ala Tyr Thr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS505_CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 82

Tyr Asn Ser Gln Arg Pro Ser

1

5

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS505_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 83

Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu Asn Gly Tyr Val

1

5

10

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS506_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 84

Ser Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS506_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 85

Asn Leu Tyr Thr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS506_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 86

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala Val Thr

1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng MS506_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 87

Gly Ala Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 88

<211> 94

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> NotI-Leader- VL-F

<400> 88

nnnngcggcc gccatggata gccaggctca ggtgctgatg ctgctgctgc tgtgggtgtc 60

agggacttgc gggcagtctg tgctgactca gcc 94

<210> 89

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> VL-R
 <400> 89
 ggggttggcc ttgggctggc ctaggaccgt cagcttggt 39
 <210> 90
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> VL-CL-F
 <400> 90
 cagcccaagg ccaacccc 18
 <210> 91
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> HindIII-VL-R
 <400> 91
 nnnnggatcc aagcttacta acattctgta gggggccactg tc 42
 <210> 92
 <211> 97
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> HD-Heavy-F
 <400> 92
 ggtgtccagg cggcgcgcac gtacttggga ctgaactatg tattcatagt ttttctctta 60
 aatggtgtcc agagtgaggt gcagctgttg gagtctg 97
 <210> 93
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> HD-Heavy-R
 <400> 93
 gggggaagac cgatgggccc ttggtggagg ctgagctcac ggtgaccagt gt 52

<210> 94
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VL FR1 Fo NruI
 <400> 94
 gctcgcgatt gcagtggcac tggctgggtt cgctaccgtg gccagggcg cccagtctgt 60
 gctgactcag ccaccctca 79
 <210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VL FR1 Fo
 <400> 95
 cagtctgtgc tgactcagcc accctca 27
 <210> 96
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VL FR1 Re
 <400> 96
 gagctgctgg taccaggaga cagcatttrtg gccaatatta gatgaagagc cagtacaaga 60
 <210> 97
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VL FR2 Fo
 <400> 97
 gccaatatta gatgaagagc cagtacaaga 30
 <210> 98
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VL FR2 Re
 <400> 98

acctaggacg gtcaccttgg tgcctccgcc gaagacataa ccrtgcaggc trtgatcctg 60
agaaccacag taataatcag cctcatcctc gga 93
<210> 99
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MS502 CL Fo
<400> 99
ggcaccaagg tgaccgtcct aggtcagccc aaggccaacc ccactgtc 48
<210> 100
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MS502 CL Re
<400> 100
gctctagaac attctgtagg ggccactgtc ttctc 35
<210> 101
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MS502 VH FR1 Fo NcoI
<400> 101
gcccatggcc gaggtgcagc tgttggagtc tggg 34
<210> 102
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MS502 VH FR1 Re
<400> 102
agcctggcgg acccagctca tntgrtgrtg gctaaagggtg aatccagagg ccgcaca 57
<210> 103
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MS502 VH FR2 Fo

<400> 103
 atgagctggg tccgccaggc t 21
 <210> 104
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VH FR2 Re
 <400> 104
 ggtgaaccga cctcttacag aatcagcgta atattttrtgn tgactrtgag gagggatccc 60
 tgagacccac tc 72
 <210> 105
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VH FR3 Fo
 <400> 105
 aaatattacg ctgattctgt aagaggtcgg ttcacc 36
 <210> 106
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VH FR3 Re
 <400> 106
 tgagctcacc gtgaccagtg taccctggcc ccagtagtcr tgrtgntgca tatttttcgc 60
 acagtaatac acggccgt 78
 <210> 107
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MS502 VH Re
 <400> 107
 tgagctcacc gtgaccagtg taccctg 27
 <210> 108
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MS502 VH Re ApaI

<400> 108

gcggggccctt ggtggaggct gagctcacgc tgaccagtgt accctg

46

<210> 109

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C2G1_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 109

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Pro Asn

20 25 30

Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu

85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 110

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C2G4_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 110

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Pro Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 111

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C3C8_Chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 111

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Pro Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Tyr Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 112

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 54_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 112

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

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

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

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

<210> 113

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 56_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 113

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

<210> 114

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-30_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 114

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

<210> 115

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-73_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 115

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

<210> 116

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-78_Chuỗi nặng biến đổi

<400> 116

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Pro Pro Asp Ser Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asn Met Phe Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 117

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C2G1_CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 117

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Pro Asn Ala Val Ser

1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C2G1_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

-

<400> 118

Gly Ser Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C2G4_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 119

Gly Ser Trp Asp Pro Ser Leu Asn Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng C3C8_CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 120

Gly Ser Trp Asp Ser Asp Leu Arg Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 54_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 121

Gly Ile Pro Pro Asp Ser Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 122

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 56_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 122

Gly Ile Pro Pro Asp Ser Ala Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-30_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 123

Gly Ile Pro Pro Asp Ser Asn Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-30_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 124

Asn Met Arg Thr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-73_CDR2 chuỗi nặng biến đổi

<400> 125

Gly Ile Pro Pro Asn Ser Asp Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dòng 2-78_CDR3 chuỗi nặng biến đổi

<400> 126

Asn Met Phe Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 127

<211> 622

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mesothelin

<400> 127

```

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

```

275	280	285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser		
290	295	300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys		
305	310	315
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met		
325	330	335
Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu		
340	345	350
Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val		
355	360	365
Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile		
370	375	380
Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu		
385	390	395
Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp		
405	410	415
Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr		
420	425	430
Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu		
435	440	445
Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp		
450	455	460
Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala		
465	470	475
Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile		
485	490	495
Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser		
500	505	510
Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr		
515	520	525
Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly		
530	535	540
Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg		
545	550	555
Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu		
565	570	575
Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser		
580	585	590
Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro		

595								600									605
Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala				
610								615									620