



(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)



1-0038338

(51)^{2022.01} G01N 33/53; C07K 16/00; C07K 16/28; (13) B
C07K 16/46; C12N 1/20; G01N 33/577;
C12N 15/87; C12N 5/02; C12N 5/20;
C12P 21/06; C07H 21/04; C12N 15/00

(21) 1-2019-05556

(22) 30/03/2018

(86) PCT/CN2018/081249 30/03/2018

(87) WO/2018/177393 04/10/2018

(30) 201710206261.2 31/03/2017 CN

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/02/2020 383A

(73) 1. Hansoh (Shanghai) Healthtech Co., Ltd. (CN)

Room 101, No.287 Xiangke Road and No.1158 Haike Road, China (Shanghai) Pilot Free Trade Zone, Shanghai, 201210, China

2. Changzhou Hansoh Pharmaceutical Co., Ltd. (CN)

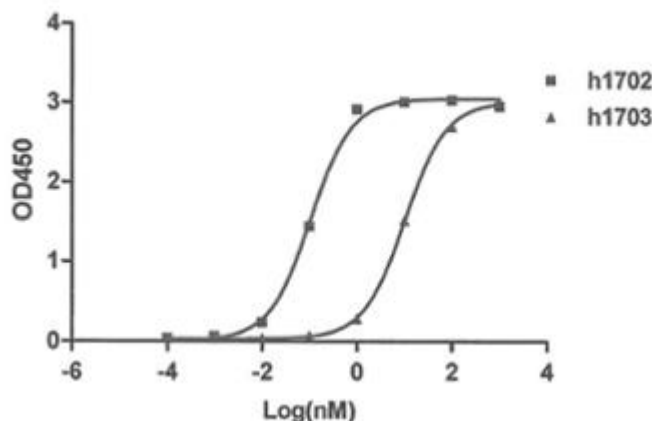
1028 Liaohe Road, Xinbei District, Changzhou, Jiangsu, 213001, China

(72) GU, Jinming (CN); WANG, Xiaohua (CN); YE, Xin (CN); YANG, Liuqing (CN); ZHANG, Ting (CN); TAO, Weikang (CN); ZHANG, Lianshan (CN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ B7-H3, MẢNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ B7-H3, MẢNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể B7-H3, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và việc sử dụng nó trong y tế. Hơn nữa, sáng chế mô tả dược phẩm chứa kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và việc sử dụng chúng làm dược phẩm. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể B7-H3 người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sản xuất dược phẩm để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến B7-H3.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, sáng chế đề cập tiếp đến kháng thể người chứa vùng CDR của kháng thể B7-H3, sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và việc sử dụng nó làm tác nhân chẩn đoán và tác nhân điều trị các bệnh liên quan đến B7-H3.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong quá trình chống khối u của sinh vật, tuy nhiên sự hoạt hóa và sự tăng sinh các tế bào T cần không chỉ tín hiệu kháng nguyên được nhận ra bởi thụ thể tế bào T (TCR), mà còn cần tín hiệu thứ hai được cung cấp bởi các phân tử đồng kích thích. Các phân tử của họ B7 thuộc siêu họ globulin miễn dịch phân tử đồng kích thích. Ngày càng nhiều các nghiên cứu đã cho thấy rằng các phân tử của họ này đóng vai trò điều hòa quan trọng đối với chức năng miễn dịch bình thường và tình trạng bệnh học trong sinh vật này.

B7-H3 là thành viên của họ B7 và thuộc loại protein xuyên màng typ I, mà chứa peptit tín hiệu ở đầu tận cùng amino, vùng biến đổi (variable region-IgV) và vùng hằng định (constant region-IgC) giống globulin miễn dịch ngoại bào, vùng xuyên màng, và vùng đuôi bào tương có 45 axit amin (Tissue Antigens. 2007 Aug; 70(2): 96-104). Hiện nay, B7-H3 có hai loại biến thể ghép nối, B7-H3a và B7-H3b. Vùng ngoại bào của B7-H3a bao gồm hai khu vực globulin miễn dịch là IgV-IgC (cũng được biết là 2IgB7-H3), trong khi vùng ngoại bào của B7-H3b bao gồm bốn khu vực globulin miễn dịch là IgV-IgC-IgV-IgC (cũng được biết là 4IgB7-H3).

Protein B7-H3 không được biểu hiện hoặc biểu hiện kém trong các mô và các tế bào bình thường, nhưng biểu hiện cao trong nhiều mô khối u khác nhau và được tương quan chặt chẽ với sự tiến triển khối u, sự tiên lượng và khả năng sống của người bệnh. Đã được thông báo lâm sàng rằng B7-H3 được biểu hiện quá mức trong nhiều loại bệnh

ung thư, đặc biệt là trong ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư thận, ung thư biểu mô đường niệu, ung thư ruột kết-thẳng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào đệm thần kinh đệm đa dạng, ung thư buồng trứng và ung thư tuyến tụy (Lung Cancer. 2009 Nov; 66(2): 245-249; Clin Cancer Res. 2008 Aug 15; 14(16): 5150-5157). Ngoài ra, cũng đã được thông báo trong tài liệu này rằng trong ung thư tuyến tiền liệt, mức biểu hiện của B7-H3 có tương quan dương tính với tính ác tính bệnh lý lâm sàng (như thể tích khối u, sự xâm lấn vùng ngoài tiền liệt tuyến hoặc điểm số Gleason), và cũng liên quan đến tiến triển bệnh ung thư (Cancer Res. 2007 Aug 15; 67(16):7893-7900). Tương tự, trong u nguyên bào đệm thần kinh đệm đa dạng, sự biểu hiện của B7-H3 có liên quan nghịch chiều với tỷ lệ sống không bệnh, và trong ung thư tụy, sự biểu hiện của B7-H3 có liên quan với sự di căn hạch bạch huyết và sự tiến triển bệnh. Do đó, B7-H3 được xem là dấu chuẩn xác định khối u mới và đích chữa trị tiềm năng.

Hiện nay, có các chiến lược điều trị đặc hiệu với đích B7-H3 cho các nghiên cứu tiền lâm sàng, ví dụ, các kháng thể có đích là B7-H3 chuột sẽ tăng cường các tế bào T dương tính-CD8 thâm nhiễm trong khối u và ức chế sự tăng trưởng khối u (Mod Pathol. 2010 Aug; 23(8): 1104-1112). Hơn nữa, sáng chế số WO 2008/066691 chỉ ra rằng các kháng thể nhận diện biến thể B7-H3 B7-H3a ức chế hiệu quả chống khối u *in vivo* trên ung thư tuyến. Trong các nghiên cứu lâm sàng, ADC của kháng thể B7-H3 chuột được nối với I^{131} có hoạt tính phóng xạ ức chế đáng kể sự tăng trưởng của u nguyên bào thần kinh ở người bệnh (J Neurooncol 97(3):409-18 (2010)). Tuy nhiên, các kháng thể B7H3 hiện nay đang nghiên cứu là các kháng thể được làm phù hợp với người mà đã được cải biến bằng kỹ thuật di truyền bằng cách làm biến đổi các kháng thể chuột để phù hợp với người. Tuy nhiên, các kháng thể được làm phù hợp với người sau khi gây miễn dịch có tính sinh miễn dịch cao hơn so với các kháng thể người hoàn chỉnh mà không chứa các thành phần kháng thể chuột bất kỳ. Nó là yếu tố bất lợi trong ứng dụng cho người.

Kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể đề cập đến sự dung hợp của protein hoặc polypeptit ngoại sinh với protein vỏ ngoài của thực khuẩn thể, để biểu hiện

protein ngoại sinh trên bề mặt của thực khuẩn thể này. Thư viện kháng thể thực khuẩn thể là thư viện kháng thể được thiết lập bằng cách kết hợp kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể, kỹ thuật khuếch đại PCR và kỹ thuật biểu hiện protein.

Lợi ích lớn nhất của thư viện kháng thể thực khuẩn thể là để điều chế kháng thể người hoàn chỉnh bằng cách bắt chước ba quá trình sản xuất kháng thể *in vivo* không cần gây miễn dịch *in vivo*. Ngoài ra, thư viện kháng thể thực khuẩn thể có các hữu ích sau: 1) Đạt được sự thống nhất của genotip và phenotip; ngoài ra, phương pháp thí nghiệm là đơn giản và nhanh, trong khi phương pháp sản xuất kháng thể truyền thống bằng công nghệ tế bào lai mất vài tháng; nhưng ngược lại công nghệ thư viện kháng thể chỉ mất rất ít tuần. 2) Sản phẩm được biểu hiện là kháng thể người hoàn chỉnh, và trọng lượng phân tử của nó là nhỏ, kháng thể này được biểu hiện chủ yếu ở dạng các đoạn hoạt tính Fab và scFv; và khi so sánh với kháng thể hoàn chỉnh, nó có sự hữu ích hiển nhiên ở khả năng thấm qua mô. 3) Dung lượng sàng lọc là lớn: công nghệ tế bào lai được sử dụng để sàng lọc trong số hàng ngàn dòng tế bào vô tính, nhưng công nghệ thư viện kháng thể có thể được sử dụng để chọn lọc từ hàng triệu hoặc hàng ngàn triệu phân tử; do đó nhiều loại kháng thể hơn sẽ thu được. 4) Ứng dụng rộng rãi: sử dụng hệ thống biểu hiện của sinh vật chưa có nhân điển hình tạo ra nhiều hữu ích rõ ràng hơn trong việc sản xuất quy mô lớn (Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec;13(6):598-602; Immunotechnology, 2013, 48(13) 48(13): 63-73).

Hiện nay, các sáng chế như WO2008100934, WO2010096734, WO2012147713, WO2015181267, WO2016044383 v.v... đã thông báo về các kháng thể B7-H3, tuy nhiên hầu hết trong số chúng là kháng thể chuột hoặc các kháng thể được làm phù hợp với người; và hầu hết trong số chúng vẫn là trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng I và giai đoạn phát hiện, trong nước hoặc ở nước ngoài, không một dược chất kháng thể có đích là B7-H3 nào là sẵn có trên thị trường; vì vậy cần thiết phát triển thêm nữa kháng thể người hoàn chỉnh B7-H3 có hoạt tính cao hơn, ái lực cao và độ ổn định cao để điều trị các bệnh và ứng dụng liên quan.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là cung cấp kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó liên kết với (các) trình tự axit amin hoặc cấu trúc ba chiều của

vùng ngoại bào của B7-H3. Hơn nữa, mục tiêu khác của sáng chế là sàng lọc và thu được các kháng thể người hoàn chỉnh kháng lại B7-H3 người có độ ổn định cao và hoạt tính mạnh mà cạnh tranh với kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh kháng thể của nó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất ADN mã hóa kháng thể này, vector chứa ADN này, thể biến nạp thu được nhờ sự biến nạp vector này, phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể của nó sử dụng thể biến nạp này, và tác nhân chẩn đoán hoặc tác nhân điều trị trong đó kháng thể này hoặc mảnh kháng thể của nó được sử dụng làm hoạt chất.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó liên kết với B7-H3 người, trong đó kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ một bất kỳ trong số kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có các đặc sau từ (i) đến (ii):

(i) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa một hoặc nhiều trình tự vùng CDR được chọn từ các trình tự sau hoặc được chọn từ các trình tự axit amin có ít nhất 95% trình tự giống với trình tự sau:

trình tự HCDR vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 10, 11 và 12; và trình tự axit amin LCDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 13, 14 và 15;

(ii) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa một hoặc nhiều trình tự vùng CDR được chọn từ các trình tự sau hoặc được chọn từ các trình tự axit amin có ít nhất 95% trình tự giống với trình tự sau:

trình tự HCDR vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 16, 17 và 18; và trình tự LCDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 19, 20 và 21.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó kháng thể đơn dòng này là

kháng thể tái tổ hợp.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó kháng thể đơn dòng này là kháng thể tái tổ hợp của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó các trình tự khung (framework-FR) của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể tái tổ hợp của người được bắt nguồn tương ứng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ dòng mầm của người, hoặc trình tự đột biến của nó.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó kháng thể tái tổ hợp của người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 6 hoặc 8 hoặc biến thể của nó; trong đó biến thể này có từ 1-10 sự thay thế axit amin trong trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 6 hoặc 8.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó kháng thể tái tổ hợp của người chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 7 hoặc 9 hoặc biến thể của nó; trong đó biến thể này có từ 1-10 sự thay thế axit amin trong trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 7 hoặc 9.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó kháng thể B7-H3 này chứa thêm vùng cố định của kháng thể người, ưu tiên là kháng thể B7-H3 này là kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện tương ứng trong trình tự SEQ ID NO: 22 và 23,; hoặc kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện tương ứng trong trình tự SEQ ID NO: 22 và 26; hoặc kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện tương ứng trong trình tự SEQ ID NO: 24 và 25.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề xuất, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên được chọn từ

nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn (single-chain antibody-scFv), vùng V được đime hóa (diabody), vùng V được làm ổn định bằng liên kết disulfit (disulfide-stabilized V region -dsFv) và peptit chứa CDR.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể B7-H3 phân tách hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, đặc trưng ở chỗ nó cạnh tranh với kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây để liên kết với B7-H3 người.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa lượng kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế hữu hiệu để điều trị bệnh, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này.

Sáng chế cũng đề xuất vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ được biến nạp vector tái tổ hợp như được mô tả trên đây, tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm các tế bào tiền nhân và các tế bào có nhân, ưu tiên là các tế bào có nhân, ưu tiên là tế bào động vật có vú hoặc tế bào nấm men.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ như được mô tả trên đây trong môi trường để tạo thành và tích lũy kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, và thu hồi kháng thể tích lũy này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó từ môi trường nuôi cấy.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện bằng miễn dịch hoặc đo B7-H3, trong đó phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này.

Sáng chế cũng đề xuất tác nhân phản ứng để phát hiện hoặc đo B7-H3 người, trong đó tác nhân phản ứng này chứa kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn

kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này.

Sáng chế cũng đề xuất tác nhân chẩn đoán để phát hiện bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3, tác nhân chẩn đoán này chứa kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3, phương pháp này bao gồm phát hiện hoặc xác định B7-H3 hoặc tế bào dương tính B7-H3 bằng cách sử dụng kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này để bào chế tác nhân chẩn đoán bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập tiếp đến tác nhân điều để điều trị bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3, tác nhân điều trị này chứa kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này, hoặc chứa được phẩm như được mô tả trên đây, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3, phương pháp này bao gồm kích thích gây ra làm chết tế bào các tế bào dương tính B7-H3 bằng cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong sáng chế này, hoặc được phẩm như được mô tả trên đây, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập tiếp đến việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trong sáng chế này để bào chế các tác nhân điều trị để điều trị các bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1: Khả năng liên kết của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên 2Ig-B7-H3 người;

Fig. 2: Khả năng liên kết của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên 4Ig-B7-H3 người;

Fig. 3: Khả năng liên kết chéo của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên B7-H3 chuột;

Fig. 4: Khả năng liên kết của các kháng thể khác nhau với các tế bào U87MG;

Fig. 5: Hiệu quả nhập nội bào của các kháng thể khác nhau trên các tế bào U87MG.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Các thuật ngữ

Để hiểu dễ dàng hơn sáng chế này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật nhất định được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được chỉ định cụ thể khác đâu đó trong tài liệu này, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng ở đây có nghĩa được hiểu thông thường bởi người có trình độ trung trong ngành thuộc lĩnh vực sáng chế này.

Như được sử dụng ở đây, mã ba chữ cái và mã một chữ cái cho các axit amin được mô tả ở đây trong J. biol. chem, 243, p3558 (1968).

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể" đề cập đến globulin miễn dịch, cấu trúc gồm bốn chuỗi peptit được nối với nhau bằng các liên kết disulfit giữa hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau. Các vùng cố định chuỗi nặng của globulin miễn dịch thể hiện các thành phần axit amin khác nhau và các thứ tự lớp, do đó trình diện các loại tính kháng nguyên khác nhau. Do đó, globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại, hoặc được gọi là các isotyp globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, tương ứng với chuỗi nặng μ , δ , γ , α và ϵ . Theo thành phần axit amin vùng khớp của nó và số và vị trí của các liên kết disulfit trong chuỗi nặng, typ giống nhau Ig có thể được chia thành các dưới lớp, ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Các chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc λ , do các vùng cố định khác nhau. Mỗi IgG trong số năm typ có chuỗi κ hoặc λ .

Trong sáng chế này, chuỗi nhẹ kháng thể như được mô tả ở đây chứa thêm vùng cố định chuỗi nhẹ, trong đó vùng cố định chuỗi nhẹ này chứa chuỗi κ , λ

người hoặc chuột hoặc biến thể của nó.

Trong sáng chế này, chuỗi nặng kháng thể như được mô tả ở đây chứa thêm vùng cố định chuỗi nặng, trong đó vùng cố định chuỗi nặng này chứa IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 người hoặc chuột hoặc biến thể của nó.

Trình tự của khoảng 110 axit amin gần với đầu tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể, thay đổi nhiều, được biết là vùng biến đổi (vùng Fv); trình tự các axit amin còn lại gần với đầu tận cùng C là khá ổn định, được biết là vùng cố định. Vùng biến đổi chứa ba vùng siêu biến (hypervariable region-HVR) và bốn vùng khung (FR) có trình tự khá bảo thủ. Ba vùng siêu biến xác định tính đặc hiệu của kháng thể, cũng được biết là vùng xác định bổ sung (complementarity determining region-CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) và mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, theo trật tự trình tự từ đầu tận cùng amin đến đầu tận cùng carboxyl là: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Ba CDR chuỗi nhẹ đề cập đến LCDR1, LCDR2, và LCDR3; ba CDR chuỗi nặng đề cập đến HCDR1, HCDR2 và HCDR3. Số và vị trí của các gốc axit amin của CDR trong các vùng LCVR và HCVR của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên ở đây tuân theo tiêu chuẩn đánh số Kabat đã biết (LCDR1-3, HCDR2-3), hoặc tuân theo tiêu chuẩn đánh số Kabat và Chothia (HCDR1).

Thuật ngữ "kháng thể người" và "kháng thể bắt nguồn từ người" được sử dụng có thể thay đổi cho nhau và đề cập đến kháng thể chứa một hoặc nhiều vùng biến đổi và cố định được bắt nguồn từ trình tự globulin miễn dịch người. Trong phương án ưu tiên đó của sáng chế, tất cả vùng biến đổi và cố định này được bắt nguồn từ các trình tự globulin miễn dịch người, nghĩa là, "kháng thể bắt nguồn từ người hoàn toàn" hoặc "kháng thể người hoàn chỉnh". Các kháng thể này có thể thu được theo nhiều cách khác nhau, bao gồm các kháng thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể, bao gồm phân lập tế bào B từ PBMC, lá lách, mô hạch bạch huyết của người và xây dựng thư viện kháng thể người trên thực khuẩn thể một sợi tự nhiên, hoặc bằng cách gây miễn dịch chuột chuyển gen biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ kháng thể người và sàng lọc.

Thuật ngữ "kháng thể chuột" được sử dụng trong sáng chế này đề cập đến kháng

thể đơn dòng kháng lại B7-H3 người được điều chế theo kiến thức và kỹ năng trong ngành. Trong quá trình điều chế, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên B7-H3, và sau đó khối tế bào lai này biểu hiện các kháng thể có trình tự hoặc đặc điểm chức năng mong muốn được phân tách. Trong phương án ưu tiên theo sáng chế, kháng thể B7-H3 chuột hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa thêm vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi kappa, lambda chuột hoặc biến thể của nó, hoặc chứa thêm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 chuột hoặc các biến thể của nó.

Thuật ngữ “kháng thể khảm”, là kháng thể được tạo thành bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể chuột với vùng cố định của kháng thể người, để làm giảm đáp ứng miễn dịch gây ra bởi kháng thể chuột. Để tạo ra kháng thể khảm, khối tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng chuột được tạo ra, và gen vùng biến đổi được tạo dòng đơn tính từ các tế bào lai của chuột, và sau đó gen vùng cố định của kháng thể người mong muốn được tạo dòng đơn tính, và nối với các gen vùng biến đổi của chuột để tạo thành gen khảm mà có thể sau đó được cài vào trong vector biểu hiện, và cuối cùng biểu hiện phân tử kháng thể khảm này trong hệ thống có nhân hoặc tiền nhân. Trong phương án ưu tiên theo sáng chế, chuỗi nhẹ của kháng thể khảm B7-H3 chứa thêm vùng cố định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ chuỗi kappa, lambda người hoặc biến thể của nó. Chuỗi nặng của kháng thể khảm B7-H3 chứa thêm vùng cố định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người hoặc biến thể của nó, và ưu tiên là chứa vùng cố định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1, IgG2 hoặc IgG4 người, hoặc biến thể của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 có đột biến axit amin (như đột biến YTE hoặc đột biến sau).

Thuật ngữ “kháng thể được biến đổi giống người”, cũng được biết là kháng thể ghép CDR, đề cập đến kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR chuột vào trong khung vùng biến đổi của kháng thể người (nghĩa là kháng thể được tạo ra trong các typ khác nhau của các trình tự khung kháng thể dòng mầm người). Kháng thể được biến đổi giống người khác phục được đáp ứng do cá thể khác loài gây ra bởi kháng thể khảm mang khối lượng lớn các thành phần protein chuột. Các trình tự vùng khung này có thể thu được từ cơ sở dữ liệu ADN đã được công bố bao gồm các trình tự gen kháng thể dòng mầm hoặc các trình tự tham chiếu đã được công bố. Ví dụ về trình tự ADN dòng mầm của các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người có thể được

tìm thấy trong ví dụ cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm người "VBase" (sẵn có trên Internet ở địa chỉ www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), cũng như được tìm thấy trong Kabat, EA, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition.

Việc ghép CDR có thể làm giảm ái lực của kháng thể B7-H3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó với kháng nguyên này, do các gốc vùng khung tiếp xúc với kháng nguyên này. Sự tương tác này có thể là kết quả của sự siêu đột biến trong các tế bào soma. Do đó, có thể vẫn cần thiết phải ghép các axit amin vùng khung thể cho này lên trên khung của các kháng thể được làm phù hợp với người. Các gốc axit amin từ kháng thể B7-H3 không phải của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tham gia vào gắn kết kháng nguyên có thể được xác định bằng cách xem xét các trình tự và các cấu trúc vùng biến đổi kháng thể đơn dòng chuột. Mỗi gốc trong khung cho CDR mà khác với dòng mầm có thể được xem là thích hợp. Nếu dòng mầm gần nhất không thể được xác định, trình tự có thể được so sánh với trình tự bình thường của typ phụ hoặc trình tự của chuột với tỷ lệ phần trăm tương đồng cao. Các gốc hiếm thấy trong khung được cho là kết quả của quá trình siêu biến soma và do đó đóng vai trò quan trọng trong liên kết.

Thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" hoặc "mảnh chức năng" của kháng thể đề cập đến một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà vẫn giữ được khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, B7-H3). Đã thấy rằng các mảnh của các kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh có thể được sử dụng cho chức năng gắn kết kháng nguyên của các kháng thể. Các ví dụ về các mảnh gắn kết này được bao gồm trong thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm: (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một bao gồm khu vực VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được nối với nhau bằng các liên kết disulfit trong vùng khớp, (iii) mảnh Fd, bao gồm khu vực VH và CH1; (iv) mảnh Fv, bao gồm khu vực VH và VL là một nhánh của kháng thể; (v) khu vực đơn hoặc mảnh dAb (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546) bao gồm khu vực VH; và (vi) vùng xác định bổ sung (CDR) tách biệt; hoặc (vii) kết hợp của hai hoặc nhiều CDR tách biệt được nối không bắt buộc bằng đoạn nối tổng hợp. Hơn nữa, mặc dù khu vực VL và khu vực VH của mảnh Fv được mã hóa bởi các gen tách biệt, chúng có thể được nối bằng đoạn nối tổng hợp sử dụng phương pháp tái

tổ hợp sao cho chúng có thể tạo ra chuỗi đơn protein với phân tử hóa trị một bằng cách nối khu vực VL và VH (được gọi là Fv chuỗi đơn (single-chain Fv-scFv); xem ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này có thể cũng nhằm để được đưa vào trong thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được sử dụng các kỹ thuật thông thường được biết trong ngành, và sàng lọc chức năng của các mảnh được sử dụng theo cách tương tự như các kháng thể nguyên vẹn. Các vị trí gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phá vỡ globulin miễn dịch nguyên vẹn bằng phương pháp hóa học hoặc enzym. Các kháng thể có thể ở dạng phenotyp khác nhau ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, typ phụ IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Các mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm Fab, F(ab')₂, Fab', kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được đime hóa (diabody), vùng V được ổn định bằng liên kết disulfit (disulfide-stabilized V region-dsFv), peptit chứa CDR, v.v...

Fab là mảnh kháng nguyên có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, mảnh này thu được bằng cách xử lý phân tử kháng thể IgG bằng proteaza papain (cắt gốc axit amin ở vị trí 224 của chuỗi H), trong đó khoảng một nửa của phía đầu tận cùng N của chuỗi H và toàn bộ chuỗi L được liên kết bằng liên kết disulfit.

Fab theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách xử lý các kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó bằng papain. Hơn nữa, Fab có thể được tạo ra bằng cách cài ADN mã hóa Fab của kháng thể vào trong vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector biểu hiện có nhân và đưa vector này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện Fab này.

F(ab')₂ là mảnh kháng thể thu được bằng cách cắt phân dưới của hai liên kết disulfit trong vùng khớp IgG bằng pepsin. Nó có trọng lượng phân tử là khoảng 100.000 và hoạt tính gắn kết kháng nguyên, và chứa hai vùng Fab được liên kết ở vị trí khớp này.

F(ab')₂ theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách xử lý kháng thể đơn dòng theo

sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó bằng pepsin. Hơn nữa, $F(ab')_2$ có thể được tạo ra bằng cách liên kết Fab' được mô tả dưới đây bằng liên kết thioete hoặc liên kết disulfit.

Fab' là mảnh kháng thể có trọng lượng phân tử là khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên. Nó thu được bằng cách cắt liên kết disulfit trong vùng khớp của $F(ab')_2$ được đề cập trên đây. Fab' theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách xử lý $F(ab')_2$ theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó bằng tác nhân khử (như dithiothreitol).

Hơn nữa, Fab' có thể được tạo ra bằng cách cài ADN mã hóa mảnh Fab' của kháng thể vào trong vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector biểu hiện có nhân và đưa vector này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện Fab' này.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn", "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" đề cập đến phân tử chứa khu vực biến đổi chuỗi nặng kháng thể (hoặc vùng; VH) và khu vực biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc vùng; VL) được liên kết bằng đoạn nối. Các phân tử scFv này có cấu trúc chung: NH_2 -VL-đoạn nối-VH-COOH hoặc NH_2 -VH-đoạn nối-VL-COOH. Các đoạn nối thích hợp trong ngành bao gồm trình tự axit amin GGGGS được lặp lại hoặc các biến thể của nó, ví dụ biến thể có từ 1-4 sự lặp lại (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 -6448). Các đoạn nối khác có thể được sử dụng trong sáng chế này được mô tả trong Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8: 725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 và Roovers et al. (2001), Cancer Immunol.

scFv theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các bước sau: thu cADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó; xây dựng ADN mã hóa scFv này; xen ADN này vào trong vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector biểu hiện có nhân; và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện scFv này.

Điabody là mảnh kháng thể trong đó scFv được dime hóa, và là mảnh kháng thể

có hoạt tính gắn kết kháng nguyên hóa trị hai. Trong hoạt tính gắn kết kháng nguyên hóa trị hai này, hai kháng nguyên này có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Điabody theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các bước sau: thu cADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó; xây dựng ADN mã hóa scFv sao cho chiều dài của đoạn nối peptit là 8 hoặc các gốc axit amin ít hơn; xen ADN này vào trong vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector biểu hiện có nhân; và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện diabody này.

dsFv thu được bằng cách thay thế một gốc axit amin trong mỗi VH và VL bằng gốc xystein, và sau đó nối các polypeptit này thông qua liên kết disulfit giữa hai gốc xystein. Gốc axit amin này được thay thế bằng gốc xystein có thể được chọn dựa trên dự đoán cấu trúc ba chiều kháng thể của kháng thể theo phương pháp đã biết (Protein Engineering, 7, 697 (1994)).

dsFv theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các bước sau: thu cADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó; xây dựng ADN mã hóa dsFv; xen ADN này vào trong vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector biểu hiện có nhân; và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện dsFv này.

Peptit chứa CDR được xây dựng bằng một hoặc nhiều vùng CDR của VH hoặc VL. Các peptit chứa một vài CDR có thể được nối trực tiếp hoặc thông qua đoạn nối peptit thích hợp.

Peptit chứa CDR theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các bước sau: xây dựng ADN mã hóa các CDR của VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó; xen ADN này vào trong vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector biểu hiện có nhân; và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện peptit này. Peptit chứa CDR có thể cũng được tạo ra bằng các phương pháp tổng hợp hóa học như phương pháp Fmoc hoặc phương pháp tBoc.

Thuật ngữ "CDR" đề cập đến một trong số sáu vùng siêu biến trong khu vực biến đổi của kháng thể mà ban đầu đóng góp vào liên kết kháng nguyên. Một trong số các định nghĩa được sử dụng thông dụng nhất cho sáu CDR được đề xuất bởi Kabat E.A. et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242. Như được sử dụng ở đây, định nghĩa Kabat về CDR chỉ áp dụng cho CDR1, CDR2 và CDR3 của khu vực biến đổi chuỗi nhẹ (CDR L1, CDR L2, CDR L3 hoặc L1, L2, L3), cũng như CDR2 và CDR3 của khu vực biến đổi chuỗi nặng (CDR H2, CDR H3 hoặc H2, H3).

Thuật ngữ "khung kháng thể" như được sử dụng ở đây, đề cập đến phần của khu vực biến đổi VL hoặc VH, mà đóng vai trò là giàn khung cho vòng gắn kết kháng nguyên (CDR) của khu vực biến đổi. Cần thiết nó là khu vực biến đổi không có các CDR.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "yếu tố xác định kháng nguyên" đề cập đến vị trí trên kháng nguyên để globulin miễn dịch hoặc kháng thể liên kết với (ví dụ, vị trí đặc hiệu trên phân tử B7-H3). Các epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liền kề hoặc không liền kề trong cấu hình không gian duy nhất. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", "liên kết chọn lọc", "gắn kết một cách chọn lọc" và "gắn kết đặc hiệu" đề cập đến liên kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên đã được xác định trước. Thông thường, kháng thể này gắn kết với ái lực (KD) là nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M, như xấp xỉ nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc ít hơn.

Thuật ngữ "KD" hoặc "Kd" đề cập đến hằng số cân bằng phân ly đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Điển hình là, kháng thể theo sáng chế gắn kết với B7-H3 với hằng số cân bằng phân ly (KD) là nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M, như nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc ít hơn, ví dụ, như được xác định sử dụng các kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR) trong thiết bị BIACORE.

Thuật ngữ "liên kết cạnh tranh" đề cập đến kháng thể nhận biết và liên kết với

cùng epitop (cũng được biết là yếu tố xác định kháng nguyên) hoặc phần của nó của vùng ngoại bào của B7H3 người khi kháng thể được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Kháng thể liên kết với cùng epitop giống như kháng thể đơn dòng theo sáng chế đề cập đến kháng thể nhận biết và liên kết với trình tự axit amin của B7-H3 người được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" như được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử ADN và phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng ưu tiên là ADN sợi kép. Axit nucleic được "liên kết hoạt động" khi nó được đặt trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, nếu gen khởi đầu hoặc gen tăng cường ảnh hưởng đến sự dịch mã trình tự mã hóa, gen khởi đầu hoặc gen tăng cường này là được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa.

Thuật ngữ "vector" đề cập đến phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà đã được nối với vector này. Theo một phương án, vector là "plasmid" đề cập đến vòng tròn ADN sợi kép mà có thể được nối trong đó đoạn ADN bổ sung. Theo phương án khác, vector là vector virus, trong đó mảnh ADN bổ sung có thể được nối vào trong hệ gen virus. Các vector được bộc lộ ở đây có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà các vector này được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có điểm khởi đầu sao chép của vi khuẩn và vector động vật có vú episom) hoặc có thể được xen vào trong hệ gen của tế bào chủ ngay khi đưa vào trong tế bào chủ, nhờ đó được sao chép cùng với hệ gen của tế bào chủ (ví dụ, vector động vật có vú không phải episom).

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên được biết nhiều trong ngành, như Cold Spring Harbor Antibody Technical Guide, Chapters 5-8 và 15. Ví dụ, chuột được gây miễn dịch bằng B7-H3 người hoặc mảnh của nó, và kháng thể thu được có thể được hồi tính, tinh chế, và phân tích trình tự bằng cách sử dụng phương pháp thông thường được biết trong ngành. Mảnh gắn kết kháng nguyên có thể cũng được tạo ra bằng phương pháp thông thường. Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được cải biến bằng kỹ thuật di truyền để thêm một hoặc nhiều vùng FR người trong vùng CDR không phải của người. (Các) trình tự dòng mầm FR người có thể thu được bằng cách duỗi thẳng dòng mầm khu vực biến đổi của kháng thể người trong cơ sở dữ liệu gen và phần mềm MOE từ trang web

ImMunoGeneTics (IMGT) tại <http://imgt.cines.fr> hoặc từ tạp chí the Journal of Immunoglobulins 2001 ISBN 012441351.

Thuật ngữ "tế bào chủ" đề cập đến tế bào mà đã được đưa vào trong đó vector biểu hiện. Các tế bào chủ có thể bao gồm tế bào vi khuẩn, vi sinh vật, thực vật hoặc động vật. Vi khuẩn mẫn cảm được biến nạp bao gồm các thành viên của họ *Enterobacteriaceae*, như các chủng của *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; *Bacillaceae* như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Các vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Các dòng tế bào chủ động vật thích hợp bao gồm dòng tế bào trứng chuột hamster Trung Quốc-CHO (Chinese hamster ovary cell line) và các tế bào NS0.

Kháng thể cải biến bằng kỹ thuật di truyền hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, (các) trình tự cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tách dòng và tái tổ hợp vào trong vector biểu hiện GS. Vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp này có thể được chuyển nhiễm ổn định trong tế bào CHO. Các hệ thống biểu hiện động vật có vú tạo ra sự glycosyl hóa các kháng thể, đặc biệt là ở vị trí đầu tận cùng N bảo thủ cao trong vùng Fc. Các dòng đơn tính ổn định thu được bằng cách biểu hiện các kháng thể các kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 người. Các dòng dương tính được nhân lên trong môi trường không chứa huyết thanh trong thiết bị phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy chứa kháng thể được tiết ra này có thể được tinh chế bằng kỹ thuật thông thường. Ví dụ, quá trình tinh chế được thực hiện sử dụng cột A hoặc G Sepharose FF đã được cân bằng bằng đệm tương thích. Các thành phần liên kết không đặc hiệu được loại bỏ bằng cách rửa. Kháng thể liên kết này được rửa giải bằng phương pháp gradient pH, và các mảnh kháng thể này được phát hiện bằng SDS-PAGE và được thu lại. Kháng thể này có thể được lọc và cô đặc bằng phương pháp thông thường. Kết tụ có thể hòa tan và các multimer có thể cũng được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường như trao đổi không loại trừ kích cỡ hoặc trao đổi ion. Các sản phẩm cần được làm lạnh ngay lập tức ở mức -70°C, hoặc làm khô lạnh.

"Dùng" và "điều trị", khi được áp dụng cho động vật, người, đối tượng thí nghiệm, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, đề cập đến sự tiếp xúc của tác nhân hoặc chế

phẩm chẩn đoán, điều trị, dược lý ngoại sinh với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học này. "Dùng" và "điều trị" có thể đề cập, ví dụ, đến các phương pháp điều trị, dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thí nghiệm. Điều trị cho tế bào bao gồm tiếp xúc tác nhân với tế bào này, cũng như tiếp xúc chất phản ứng với dịch, trong đó dịch này tiếp xúc với tế bào này. "Dùng" và "điều trị" cũng có nghĩa là điều trị *in vitro* và *ex vivo*, ví dụ, cho tế bào bằng tác nhân, chế phẩm gắn kết, chẩn đoán hoặc bằng tế bào khác. "Điều trị", khi được áp dụng cho người, động vật hoặc đối tượng nghiên cứu, đề cập đến điều trị chữa bị, các phương pháp phòng bệnh hoặc ngăn ngừa, các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

"Điều trị" nghĩa là dùng tác nhân điều trị, như chế phẩm chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất gắn kết theo sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài cho bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà tác nhân này đã biết là có hoạt tính điều trị. Điển hình là, tác nhân này được dùng với khối lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh trong người bệnh hoặc nhóm được điều trị, để làm giảm tiến triển của (các) triệu chứng này hoặc để ngăn ngừa tiến triển của bệnh đến mức độ có thể đo được về mặt lâm sàng bất kỳ. Khối lượng tác nhân điều trị là hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ (cũng được đề cập là "khối lượng hữu hiệu để điều trị bệnh") có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi và trọng lượng của người bệnh, và khả năng của tác nhân để gây ra đáp ứng mong muốn ở người bệnh. Liệu triệu chứng bệnh có được thuyên giảm hay không thì có thể được đánh giá bằng phép đo lâm sàng bất kỳ được chỉ định bởi bác sỹ hoặc nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe để đánh giá mức độ trầm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng này. Ngay cả khi phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc sản phẩm) là không hữu hiệu trong việc điều trị làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh đích trong mỗi bệnh nhân, nên làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh đích này với số lượng người bệnh có ý nghĩa thống kê như được xác định bằng thử nghiệm thống kê đã biết trong ngành như thử nghiệm t-Student, thử nghiệm chi bình phương, thử nghiệm U theo Mann và Whitney, thử nghiệm Kruskal-Wallis (thử nghiệm H), thử nghiệm Jonckheere-Terpstra và thử nghiệm Wilcoxon.

"Thay đổi bảo thủ" hoặc "sự thay thế hoặc thay thế bảo thủ" đề cập đến các sự

thay thế các axit amin trong protein bằng axit amin khác có các đặc điểm tương tự (ví dụ, sự tích điện, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/tính ưa nước, cấu hình và độ không mềm dẻo của chuỗi chính, v.v...), sao cho các sự thay đổi này có thể được tạo ra thường xuyên mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein này. Sẽ được đánh giá bởi chuyên gia trong lĩnh vực trong ngành, nhìn chung sự thay thế một axit amin trong vùng không quan trọng của polypeptit sẽ không làm ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Page 224, (xuất bản lần thứ 4)). Hơn nữa, các sự thay thế bởi các axit amin tương tự về mặt cấu trúc hoặc chức năng là khó có khả năng xảy ra sự phá vỡ hoạt tính sinh học.

"Khối lượng" bao gồm khối lượng thích hợp để làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa triệu chứng hoặc tình trạng bệnh lý. Khối lượng hữu hiệu cũng có nghĩa là khối lượng thích hợp để cho phép hoặc dễ dàng chẩn đoán. Khối lượng hữu hiệu cho người bệnh cụ thể hoặc đối tượng thú y cụ thể có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như: tình trạng bệnh cần được điều trị, tình trạng sức khỏe tổng thể của người bệnh, đường dùng và liều dùng, và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ. Khối lượng hữu hiệu có thể là liều dùng tối đa hoặc chế độ liều tối đa nhưng tránh được đáng kể các tác dụng phụ hoặc hậu quả gây độc.

"Ngoại sinh" đề cập đến chất mà được tạo ra bên ngoài cơ thể sinh vật, tế bào hoặc người, phụ thuộc vào hoàn cảnh. "Nội sinh" đề cập đến chất tạo ra trong tế bào, cơ thể sinh vật hoặc người hoặc phụ thuộc vào hoàn cảnh.

"Giống" đề cập đến mức độ giống nhau của trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc hai trình tự polypeptit. Khi các vị trí trong hai trình tự được so sánh ở cùng vị trí bazơ hoặc dưới đơn vị monome axit amin, ví dụ, nếu mỗi vị trí của hai phân tử ADN cả hai đều là adenin, các phân tử này được xem là tương đồng ở vị trí này. Phần trăm giống nhau giữa hai trình tự là giá trị bằng tổng số các vị trí tương đồng hoặc giống nhau cùng có mặt chung ở hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh $\times 100$. Ví dụ, trong sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu (các) trình tự, nếu có 6 vị trí giống nhau hoặc tương đồng trong số 10 vị trí giữa hai chuỗi, thì hai trình tự này được cho là có sự tương đồng 60%; nếu có 95 vị trí giống hoặc tương đồng trong số 100 vị trí giữa hai trình tự,

thì hai trình tự này được cho là có sự tương đồng là 95%. Nhìn chung, so sánh được thực hiện khi phần trăm tương đồng tối đa thu được bằng cách sắp xếp thẳng hàng hai trình tự.

Như được sử dụng ở đây, các sự thể hiện "tế bào", "dòng tế bào" và "dịch nuôi cấy tế bào" được sử dụng có thể hoán đổi cho nhau, và tất cả các thuật ngữ này bao gồm thể hệ con của chúng. Do đó, các từ "thể biến nạp" và "tế bào được biến nạp" bao gồm các tế bào thử nghiệm đầu tiên và các dịch nuôi cấy từ các tế bào này, không kể đến số lần cấy truyền. Nên cũng được hiểu rằng tất cả các thể hệ con có thể không giống chính xác về trình tự ADN do các đột biến chủ ý hoặc vô tình. Thể hệ con đột biến có chức năng hoặc hoạt tính sinh học tương tự khi được sàng lọc tế bào được biến nạp ban đầu cũng được bao gồm. Trong trường hợp tên khác nhau, có thể được hiểu dễ dàng từ nội dung này.

Như được sử dụng ở đây, "phản ứng chuỗi polymeraza-polymerase chain reaction" hoặc "PCR" đề cập đến quy trình hoặc kỹ thuật mà một khối lượng nhỏ phân axit nucleic, ARN, và/hoặc ADN cụ thể được khuếch đại như được mô tả ví dụ trong Patent Mỹ No. 4,683,195. Nhìn chung, cần thiết phải thu được thông tin di truyền từ đoạn cuối hoặc phía ngoài vùng đích, nhờ đó các đoạn mồi oligonucleotit có thể được thiết kế; các đoạn mồi này là giống hoặc tương tự với các sợi đối lập của khuôn được khuếch đại. Các nucleotit đầu tận cùng 5' của hai đoạn mồi có thể là giống với đầu tận cùng của vật liệu cần được khuếch đại. PCR có thể được sử dụng để khuếch đại các trình tự ARN đặc hiệu, các trình tự ADN đặc hiệu từ ADN hệ gen, và cADN được sao chép từ trình tự ARN tế bào tổng số, thực khuẩn thể hoặc trình tự plasmit, v.v... Một cách tổng thể xem, Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). PCR được sử dụng ở đây được xem là ví dụ (nhưng không phải là duy nhất) về phương pháp phản ứng polymeraza axit nucleic để khuếch đại mẫu thử nghiệm axit nucleic, phương pháp này bao gồm sử dụng axit nucleic đã biết làm đoạn mồi và polymeraza axit nucleic để khuếch đại hoặc tạo ra phần axit nucleic cụ thể này.

"Tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả sau đó có thể (nhưng không nhất thiết) xảy ra, bao gồm trong đó sự kiện hoặc tình huống

xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, "tùy ý chứa từ 1-3 vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể" nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự đặc hiệu có thể nhưng không nhất thiết phải có mặt.

"Dược phẩm" nghĩa là hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất được mô tả ở đây hoặc muối dược dụng/sinh lý dụng hoặc tiền dược chất của nó, cùng với các thành phần hóa học khác, như chất mang và dược dụng/sinh lý dụng. Mục đích của dược phẩm là để tăng cường dùng cho cơ thể sinh vật và dễ dàng hấp thu các thành phần có hoạt tính và nhờ đó sử dụng hoạt tính sinh học.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện bằng miễn dịch hoặc xác định B7-H3, chất phản ứng để phát hiện bằng miễn dịch hoặc đo B7-H3, phương pháp để phát hiện bằng miễn dịch hoặc xác định tế bào biểu hiện B7-H3, và tác nhân chẩn đoán để chẩn đoán bệnh liên quan đến tế bào dương tính B7-H3, chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu B7-H3 người và liên kết với trình tự axit amin vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, làm thành phần hoạt tính.

Trong sáng chế này, phương pháp để phát hiện hoặc xác định khối lượng B7-H3 có thể là phương pháp đã biết bất kỳ. Ví dụ, bao gồm sự phát hiện miễn dịch hoặc thử nghiệm.

Sự phát hiện miễn dịch hoặc thử nghiệm này là phương pháp để phát hiện hoặc xác định khối lượng kháng thể hoặc kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng nguyên hoặc kháng thể được đánh dấu. Các ví dụ về sự phát hiện miễn dịch hoặc thử nghiệm bao gồm phương pháp kháng thể miễn dịch được đánh dấu bằng chất có hoạt tính phóng xạ (radioactive substance labeled immunological antibody method-RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (enzyme immunoassay-EIA hoặc ELISA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (fluorescent immunoassay-FIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang, phương pháp thâm western, các phương pháp hóa lý, v.v...

Các bệnh được đề cập trên đây đề cập đến tế bào dương tính B7-H3 có thể được chẩn đoán bằng cách phát hiện hoặc xác định các tế bào biểu hiện B7-H3 bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể của nó theo sáng chế.

Để phát hiện tế bào biểu hiện polypeptit này, phương pháp phát hiện bằng miễn dịch có thể được sử dụng và ưu tiên là phương pháp kết tủa miễn dịch, phương pháp nhuộm tế bào huỳnh quang hoặc nhuộm hóa mô miễn dịch v.v... có thể được sử dụng. Hơn nữa, phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang v.v... sử dụng hệ thống FMAT8100HTS (Applied Biosystem) có thể được sử dụng.

Trong sáng chế này, mẫu sống để phát hiện hoặc xác định B7-H3 không bị giới hạn cụ thể vì nó có thể chứa tế bào biểu hiện B7-H3, như tế bào mô, máu, huyết tương, huyết thanh, dịch tụy, nước tiểu, phân, dịch mô hoặc dịch nuôi cấy.

Tác nhân chẩn đoán này chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể của nó theo sáng chế có thể chứa thêm tác nhân để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể hoặc chất phản ứng để phát hiện phản ứng này phụ thuộc vào phương pháp chẩn đoán mong muốn. Tác nhân để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể này bao gồm các đệm, các muối, và tác nhân tương tự. Các chất phản ứng để phát hiện bao gồm các chất phản ứng được sử dụng thông thường trong phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc phép đo, như kháng thể thứ cấp được đánh dấu mà nhận biết kháng thể đơn dòng này, các mảnh kháng thể hoặc đoạn nối của nó, cơ chất tương ứng với chất đánh dấu v.v...

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị bệnh liên quan đến các tế bào dương tính B7-H3 người, đặc biệt là trong điều trị bệnh ung thư và triệu chứng viêm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả tiếp dưới đây liên hệ đến ví dụ, tuy nhiên phạm vi của sáng chế không bị giới hạn. Trong các ví dụ của sáng chế, trong đó các điều kiện cụ thể không được mô tả, thí nghiệm thường được tiến hành dưới các điều kiện thông thường như được mô tả trong Cold Spring Harbor Antibody Technology Laboratory Manual, Molecular Cloning Manual, hoặc dưới các điều kiện được đề xuất bởi nhà sản xuất vật liệu hoặc các sản phẩm thô. Trong đó nguồn chất phản ứng không được đưa ra cụ thể, các chất phản ứng là các chất phản ứng thông thường sẵn có trên thị trường.

Ví dụ 1. Điều chế kháng nguyên B7-H3 và protein để phát hiện

Thiết kế kháng nguyên B7-H3

B7-H3 người như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 1 được sử dụng làm khuôn cho B7-H3 theo sáng chế, và trình tự axit amin của kháng nguyên này và protein để phát hiện được đưa vào trong sáng chế này được thiết kế. Trừ khi được chỉ định khác, kháng nguyên B7-H3 sau là B7-H3 người.

Protein có chiều dài hoàn chỉnh B7-H3 người: B7-H3 (SEQ ID NO: 1):

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVOVPEDPVVALVGTDATLCCSFS
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGODOGSAYANRTALFPDLLAOGNASL
RLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDRLRPGDVT
ITCSSYQGYPEAEVFWODGQGVPLTGNVTTSQMANEOGLFDVHSILRVVLGAN
GTYSCLVRNPVLQODAHSSVTITPQRSPTGAVEVOVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAOGNASL
RLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDRLRPGDVT
ITCSSYRGYPEAEVFWODGQGVPLTGNVTTSQMANEOGLFDVHSVLRVVLGAN
GTYSCLVRNPVLQODAHGSVTITGQPMTFPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFV
CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHS DSKEDDGQEIA

Lưu ý:

Phần được gạch chân kép là peptit tín hiệu (Peptit tín hiệu: 1-28);

Phần được gạch chân là là khu vực ngoại bào của B7-H3 (Là khu vực ngoại bào: 29-466), trong đó 29-139 là khu vực 1 typ-V giống Ig, và 145-238 là khu vực 1 typ-C2 giống Ig; 243-357 là khu vực 2 typ-V giống Ig, 363-456 là khu vực 2 typ-C2 giống Ig;

Phần nét đứt là phần khu vực xuyên màng (Khu vực xuyên màng: 467-487);

Phần in nghiêng là khu vực nội bào (Khu vực bào chất: 488-534).

Trình tự axit amin chiều dài hoàn chỉnh B7-H3 chuột (SEQ ID NO: 2)

MLRGWGGPSVGVCVRTALGVLCLCLTGALEVOVSEDPVVALVDTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNAS
LRLQVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDRLRPGN
MVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVV
LGANGTYSCLVRNPVLQODAHGSVTITGOPLTFPPEALWVTVGLSVCLVLLV
ALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGDGE GSKTALRPLKPSENKEDDGQEIA

Lưu ý:

Phần được gạch chân kép là peptit tín hiệu (Peptit tín hiệu: 1-28);

Phần được gạch chân là là khu vực ngoại bào của B7-H3 (Là khu vực ngoại bào: 29-248), trong đó 29-139 là khu vực typ V giống Ig, và 145-238 là khu vực typ C2 giống Ig;

Phần nét đứt là phần khu vực xuyên màng (Khu vực xuyên màng: 249-269);

Phần in nghiêng là khu vực nội bào (Khu vực bào chất: 270-316).

Kháng nguyên B7-H3 người (SEQ ID NO: 3) được sử dụng để sàng lọc và phát hiện là sản phẩm thương mại (R&D cat# 1949-B3-050/CF, được viết tắt là 2Ig-B7-H3), và trình tự là như sau:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQODAHSSVTITPQR
SPTG-HHHHHH

Lưu ý: Phần được gạch chân là vùng ngoại bào của B7-H3; phần in nghiêng là dấu chuẩn đuôi His.

Kháng nguyên B7-H3 người (SEQ ID NO: 4) được sử dụng để phát hiện là sản phẩm thương mại (SinoBiological cat # 11188-H08H, được viết tắt là 4Ig-B7-H3), và trình tự là như sau:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQODAHSSVTITPQR
SPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSFSPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH
SFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGS
AAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGV
PLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQODAHGSVTI
TGQPM-T-HHHHHH

Lưu ý: Phần được gạch chân là vùng ngoại bào của B7-H3; phần in nghiêng là dấu chuẩn đuôi His.

Kháng nguyên B7-H3 chuột (SEQ ID NO: 5) được sử dụng để sàng lọc và phát hiện là sản phẩm thương mại (R&D cat#1397-B3-050/CF), và trình tự là như sau:

VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEG
RDOGSAYSNRALTALFPDLLVQGNASRLRLQVRVTDEGSYTCFVSIODFDSAASL
QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGN
VTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQODAHGSVTITGOPL
TF-HHHHHH

Lưu ý: Phần được gạch chân là vùng ngoại bào của B7-H3; phần in nghiêng là dấu chuẩn đuôi His.

Ví dụ 2. Sàng lọc (các) trình tự dương tính liên kết đặc hiệu với B7-H3 người

Các tế bào B được phân lập từ PBMC người, lá lách và mô hạch bạch huyết, và ARN được chiết để xây dựng thư viện kháng thể thực khuẩn thể scFv nguyên thể (dung lượng $3,2 \times 10^{10}$). Thư viện kháng thể thực khuẩn thể scFv nguyên thể được xây dựng này được đóng gói để tạo thành các hạt thực khuẩn thể, và sau đó đưa đến bước sàng lọc bằng phương pháp pha lỏng. Thực khuẩn thể này đã được liên kết với B7-H3 được biotiny hóa trong pha lỏng, và sau đó tách bằng các hạt từ tính streptavidin. Để thu được (các) trình tự dương tính liên kết với B7-H3 người (R&D cat# 1949-B3-050/CF), B7-H3 người được biotiny hóa được sử dụng để sàng lọc, và 500 dòng tế bào đơn tính được lấy và đóng gói vào trong các kháng thể scFv thực khuẩn thể để thử nghiệm ELISA thực khuẩn thể. Hoạt tính liên kết của thực khuẩn thể đơn dòng với B7-H3 người (R&D cat# 1949-B3-050/CF) và B7-H3 chuột (R&D cat#1397-B3-050/CF) được thử nghiệm tách biệt: 1 µg/ml B7-H3 người hoặc B7-H3 chuột và 1% BSA được phủ lên đĩa ELISA, bổ sung phần thực khuẩn thể nổi được pha loãng ở tỷ lệ 1:1 bằng đệm phong bế, và được phát hiện bằng HRP kháng-M13; các dòng đơn tính có giá trị ELISA OD450 lớn hơn 0,5, có các tỷ lệ giữa các giá trị ELISA OD450 để gắn kết với B7-H3 người hoặc chuột với giá trị ELISA OD450 để gắn kết với 1% BSA lớn hơn 2,0 được chọn lọc, và thu được 9 dòng đơn tính.

Ví dụ 3. Xây dựng các kháng thể đơn dòng có chiều dài hoàn chỉnh

Kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh được xây dựng cho 9 dòng đơn tính này thu được bằng cách sàng lọc thư viện thực khuẩn thể, và sau đó hai kháng thể (tương ứng là h1702 và h1703) được xác nhận để có ái lực mạnh bằng thử nghiệm gắn kết ELISA. Quá trình xây dựng kháng thể đơn dòng có chiều dài hoàn chỉnh là như sau:

Dựa trên (các) trình tự kháng thể scFv thu được bằng cách sàng lọc thực khuẩn thể, các đoạn môi được thiết kế để xây dựng mảnh gen VH/VK/VL của mỗi trình tự kháng thể chuỗi đơn bằng PCR. Các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của h1702 và h1703 thu được.

>trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng h1702

QVQLVQSGGGVVPQGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARSARLYASFDYWGQG
ALVTVSS

SEQ ID NO: 6

> trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ h1702

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRS
SGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 7

> trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng h1703

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
STYYADSVKGRYTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGVGPVHALDVWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 8

> trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ h1703

DIRLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISTYLNWYQQKPGKAPILLINAVSGLQSGVP
SRFSGSGSGTHFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPMWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 9

Lưu ý: Trật tự là FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, các chữ in nghiêng trong trình tự các trình tự FR, và các trình tự CDR được gạch chân.

Các trình tự CDR trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mỗi kháng thể được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Các vùng CDR của mỗi chuỗi nặng và nhẹ

Kháng thể	HC		LC	
1702	HCDR1	GFIFSSSA SEQ ID NO: 10	LCDR1	SGSVSTSHY SEQ ID NO: 13
	HCDR2	ISYDGSNK SEQ ID NO: 11	LCDR2	NTN SEQ ID NO: 14
	HCDR3	ARSARLYASFDY SEQ ID NO: 12	LCDR3	AIHVDRDIWV SEQ ID NO: 15
1703	HCDR1	GFTFSSYA SEQ ID NO: 16	LCDR1	QSISTY SEQ ID NO: 19
	HCDR2	ISGSGGST SEQ ID NO: 17	LCDR2	AVS SEQ ID NO: 20
	HCDR3	AKGVGPVHALDV SEQ ID NO: 18	LCDR3	QQSYSTPMWT SEQ ID NO: 21

Vùng biến đổi của kháng thể sau đó được tái tổ hợp tương đồng với mảnh gen vùng cố định (CH1-FC/CL) để xây dựng kháng thể hoàn chỉnh VH-CH1-FC/VK-CL/VL-CL.

Các kháng thể hoàn chỉnh được xây dựng h1702-IgG1, h1703-IgG1 các trình tự là như sau:

h1702-IgG1:

Trình tự axit amin chuỗi nặng h1702-IgG1: (SEQ ID NO: 22)

QVQLVQSGGGVVPQGTSLRLSCAASGFISSAMHWVRQAPGKGLEWVAV
 ISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYA
 SFDYWGGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ h1702: Lamada (SEQ ID NO: 23)

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY
 NTNTRSSGVDPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCAIHVDRDIWVFGGGT
 KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
 AGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE
 CS

h1703-IgG1:

Trình tự axit amin chuỗi nặng h1703-IgG1: (SEQ ID NO: 24)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 AISGSGGSTYYYADSVKGRYTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGVGP
 VHALDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ h1703: Kappa (SEQ ID NO: 25)

DIRLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPILLINAVSG
 LQSGVPSRFSGSGSGTHFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPMWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Để cải thiện thêm nữa độ ổn định của kháng thể, các axit amin của trình tự chuỗi nhẹ h1702 được gây đột biến, trong đó đột biến đặc hiệu bao gồm gốc axit amin thứ

nhất Q ở đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ được thay bằng D, gốc axit amin thứ nhất S ở đầu tận cùng C bị xóa, để thu được kháng thể đơn dòng ổn định và đồng nhất hơn.

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ h1702-1 có các sự thay đổi bằng đột biến: (SEQ ID NO: 26)

```
DTVVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY
NTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGT
KLTVLGQPKANPTVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE
C
```

Ví dụ 4. Biểu hiện và tinh chế các kháng thể người hoàn chỉnh

Các plasmit biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể được chuyển nhiễm tương ứng vào trong các tế bào HEK293E với tỷ lệ là 1,5:1, và phân nổi dịch nuôi cấy tế bào được thu lại sau 6 ngày, và loại bỏ mảnh vụn tế bào bằng ly tâm tốc độ cao, và tinh chế được thực hiện bằng cột Protein A. Cột này được rửa bằng PBS cho tới khi số đọc A280 giảm xuống đường cơ sở. Protein đích được rửa giải bằng dung dịch rửa giải axit có pH nằm trong khoảng từ pH 3,0 - 3,5 và trung hòa bằng Tris-HCl 1M, pH 8,0-9,0. Mẫu được rửa giải được cô đặc thích hợp và được tinh chế tiếp bằng sắc ký gel Superdex 200 (GE) được cân bằng bằng PBS để loại bỏ khối kết tụ. Đỉnh monome được thu lại và chia thành các phần bằng nhau để sử dụng.

Hiệu suất và hiệu quả có lợi của các kháng thể theo sáng chế được phát hiện bằng các phương pháp thử nghiệm sau:

Ví dụ thử nghiệm 1. Thử nghiệm gắn kết ELISA

Để thử nghiệm khả năng liên kết của kháng thể B7-H3 được sàng lọc với các dạng B7-H3 người khác nhau *in vitro*, 2Ig-B7-H3 người (Cat.#1949-B3-050/CF, R&D) và 4Ig-B7-H3 người (Cat# 11188-H08H, Sino Biological) được sử dụng cho các thử nghiệm gắn kết *in vitro*.

Protein B7-H3 người (2Ig/4Ig) được pha loãng đến nồng độ 1 µg/ml bằng đệm PBS, pH 7,4 (Sigma, P4417-100TAB), và được cho vào đĩa Elisa 96-lỗ với thể tích 100 µl/lỗ (Corning, CLS3590-100 EA), và để ở 4°C qua đêm, trong từ 16-20 giờ. Sau khi

loại bỏ chất lỏng, dung dịch phong bế sữa không kem 5% (bột sữa không kem GuangMing) được pha loãng bằng đệm PBST (pH 7,4 PBS chứa 0,05% Tween-20) được bổ sung với 120 $\mu\text{l/l}$, và ủ hỗn hợp này ở 37°C trong 2 giờ để phong bế. Kết thúc khoảng thời gian phong bế, loại bỏ dung dịch phong bế, và rửa đĩa này 4 lần bằng đệm PBST. Sau đó, 100 $\mu\text{l/l}$ kháng thể B7-H3 tương ứng bằng hàng loạt độ pha loãng được bổ sung. Nồng độ ban đầu là 1 μM , sau đó pha loãng bằng đệm PBST đến 8 gradient, và ủ ở 37°C trong 1 giờ trong thiết bị ủ. Sau khi ủ, loại bỏ dung dịch phản ứng trong đĩa, và rửa đĩa này 4 lần bằng PBST. Mẫu Fcy IgG người kháng dê được đánh dấu HRP đặc hiệu kháng thể thứ hai (Jackson Immuno Research, 109-005-008) pha loãng bằng PBST (1:4000) được bổ sung với 100 $\mu\text{l/l}$, và được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi rửa đĩa này 4 lần bằng PBST, chất nền tạo màu TMB (KPL, 52-00-03) được bổ sung với 100 $\mu\text{l/l}$, ủ trong 3-5 phút ở nhiệt độ trong phòng, và H_2SO_4 1M được bổ sung với 100 $\mu\text{l/l}$ để dừng phản ứng này. Đọc giá trị hấp thụ sử dụng máy đọc vi đĩa NOVOSTa ở 450 nm, và giá trị EC50 cho liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên được tính toán. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2, Fig. 1 và Fig. 2.

Bảng 2. Khả năng liên kết của các kháng thể khác nhau với 2Ig-B7-H3 người và kháng nguyên 4Ig- B7-H3

EC50	2Ig-B7-H3 người (nM)	4Ig-B7-H3 người (nM)
h1702	0,11	0,16
h1703	10,28	2,10

Các kết quả này cho thấy rằng h1702 và h1703 có khả năng gắn kết ý nghĩa với cả hai 2Ig-B7-H3 và 4Ig-B7-H3 người, và h1702 có khả năng gắn kết mạnh hơn.

Ví dụ thử nghiệm 2. Thử nghiệm liên kết chéo với B7-H3 có nguồn gốc từ các loài khác nhau

Để thử nghiệm khả năng gắn kết của kháng thể B7-H3 được sàng lọc với B7-H3 có nguồn gốc từ các loài khác nhau *in vitro*, B7-H3 chuột (Cat. #1397-B3-050/CF, R&D) được sử dụng cho các thử nghiệm gắn kết *in vitro*.

Protein B7-H3 có nguồn gốc từ các loài khác nhau (B7-H3 chuột) được pha loãng đến nồng độ 1 µg/ml bằng đệm PBS, pH 7,4 (Sigma, P4417-100TAB), được cho vào đĩa vi chuẩn 96-lỗ với thể tích 100 µl/lỗ (Corning, CLS3590-100 EA), và được đặt ở 4°C qua đêm trong 16-20 giờ. Sau khi loại bỏ chất lỏng, dung dịch phong bế 5% sữa không kem (bột sữa không kem GuangMing) pha loãng bằng đệm PBST (pH 7,4 PBS chứa 0,05% Tween-20) được bổ sung với 120 µl/lỗ, và ủ hỗn hợp này ở 37°C trong 2 giờ để phong bế. Kết thúc khoảng thời gian phong bế, loại bỏ dung dịch phong bế, và rửa đĩa này 4 lần bằng đệm PBST. Sau đó, 100 µl/lỗ kháng thể B7-H3 tương ứng ở nồng độ ban đầu là 1 µM được cho vào, pha loãng bằng đệm PBST đến 8 gradient, và ủ ở 37°C trong 1 giờ trong thiết bị ủ. Sau khi ủ, loại bỏ dung dịch phản ứng trong đĩa, và rửa đĩa này 4 lần bằng PBST, và kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcγ kháng IgG người của cừu được đánh dấu HRP (Jackson Immuno Research, 109-005-008) pha loãng bằng PBST (1:4000) được bổ sung với 100 µl/lỗ, ủ trong 1 giờ ở 37 °C. Sau khi rửa đĩa này 4 lần bằng PBST, chất nền tạo màu TMB (KPL, 52-00-03) được bổ sung với 100 µl/lỗ, ủ trong 3-5 phút ở nhiệt độ trong phòng, và H₂SO₄ 1M được bổ sung với 100 µl/lỗ để dừng phản ứng này, đọc giá trị hấp thụ sử dụng máy đọc vi đĩa NOVOSTa ở 450 nm, giá trị EC₅₀ cho liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên được tính toán (các kết quả được thể hiện trong bảng 3 và Fig. 3).

Bảng 3. Khả năng liên kết của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên B7-H3 chuột

EC ₅₀	B7-H3 chuột (nM)
h1702	18,12
h1703	86,68

Các kết quả này cho thấy rằng khả năng liên kết của h1702 và h1703 với B7-H3 chuột là yếu, cho thấy rằng hai kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với B7-H3 người.

Ví dụ thử nghiệm 3. Thử nghiệm Biacore về ái lực kháng thể

Ái lực phản ứng của kháng thể kháng B7-H3 với B7-H3 người và chuột được

xác định sử dụng thiết bị Biacore, GE.

Chip cảm biến sinh học Protein A (Cat. # 29127556, GE) được sử dụng để ghi lại ái lực khối lượng nhất định kháng thể được thử nghiệm. Một loạt kháng nguyên 2Ig-B7-H3 người (Cat. #1949- B3-050/CF, R&D), kháng nguyên 4Ig-B7-H3 người (Cat. #11188-H08H, Sino Biological) hoặc kháng nguyên B7-H3 chuột (Cat. # 1397-B3-050/CF, R&D) được pha loãng ở các nồng độ khác nhau được cho chảy qua bề mặt của chip này. Tín hiệu phản ứng thời gian thực được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Biacore (Biacore T200, GE), để thu được các đường cong liên kết và phân ly. Sau khi hoàn thành mỗi chu trình phân ly, rửa chip sinh học và tái tạo bằng dung dịch tái tạo glyxin- axit hydrocloric (pH 1,5) (Cat.#BR-1003-54, GE). Đệm được sử dụng trong thí nghiệm này là dung dịch đệm HBS-EP (pH 7,4) (Cat. # BR-1001-88, GE).

Dữ liệu thí nghiệm được điều chỉnh bằng phần mềm GE phiên bản đánh giá BIA 4.1 trong mô hình Langmuir (1:1) để thu được các giá trị ái lực. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong các bảng 4-6.

Bảng 4. Ái lực phản ứng của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên 2Ig-B7-H3 người

Kháng thể	Kháng nguyên	Ái lực (M)
h1702	2Ig-B7-H3 người	7,97E-7
h1703		4,48E-7

Bảng 5. Ái lực phản ứng của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên 4Ig-B7-H3 người

Kháng thể	Kháng nguyên	Ái lực (M)
h1702	4Ig-B7-H3 người	8,55E-9
h1703		-

Bảng 6. Ái lực phản ứng của các kháng thể khác nhau với kháng nguyên B7-H3 chuột

Kháng thể	Kháng nguyên	Ái lực (M)
h1702	B7-H3 chuột	1,47E-6
h1703		5,02E-7

Các kết quả ái lực trong thử nghiệm Biacore cho thấy rằng h1702 có ái lực mạnh với 4Ig-B7-H3 người, đạt ở mức nM, trong khi ái lực với 2Ig-B7-H3 người hoặc B7-H3 chuột khá là yếu hơn; h1703 có ái lực yếu hơn với 4Ig-B7-H3 người, 2Ig-B7-H3 người và B7-H3 chuột.

Ví dụ thử nghiệm 4. Thử nghiệm gắn kết tế bào *in vitro*

Trong thí nghiệm này, liên kết của kháng thể được đánh giá dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang của kháng thể liên kết trên bề mặt tế bào. Sau khi ủ 10 μ g kháng thể sơ cấp với 2×10^5 các tế bào U87MG trên đá trong 30 phút, loại bỏ kháng thể dư bằng cách rửa. Ủ các tế bào này bằng Fc IgG người kháng APC (Biolegend, 409306) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó loại bỏ kháng thể dư, đọc tín hiệu huỳnh quang trên bề mặt tế bào sử dụng BD Verse (các kết quả được thể hiện trong Fig. 4). Các kết quả này cho thấy rằng h1702 liên kết đặc hiệu với U87MG tế bào khối u biểu hiện quá mức B7-H3.

Ví dụ thử nghiệm 5. Thử nghiệm nhập nội bào *in vitro*

Trong thí nghiệm này, hiệu quả nhập nội bào của kháng thể được đánh giá dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang xác định kháng thể hấp thu. Kháng thể B7-H3 này và Fc IgG người kháng APC (Biolegend, 409306) được trộn với tỷ lệ mol là 1:2 và được ủ trên đá trong 15 phút. Sau khi ủ hỗn hợp kháng thể này với 2×10^5 tế bào U87MG trên đá trong 30 phút, loại bỏ kháng thể dư bằng cách rửa, và sau đó chuyển tế bào này sang môi trường được làm ấm trước ở 37°C, và ủ ở 37°C tương ứng trong 0, 15, 30, 60 và 120 phút. Ly tâm các tế bào này và tái tạo huyền phù trong đệm rửa giải kháng thể để giữ sạch các kháng thể. Sau khi ủ trong 7 phút ở nhiệt độ trong phòng, loại bỏ đệm rửa giải kháng thể bằng cách rửa, và đọc tín hiệu huỳnh quang nội bào sử dụng BD Verse

(các kết quả được thể hiện trong Fig. 5). Các kết quả này cho thấy rằng cả hai h1702 và h1703 được nhập nội bào hiệu quả vào trong các tế bào sau khi liên kết với tế bào U87MG.

Ví dụ thử nghiệm 6. Đánh giá $T_{1/2}$ trên chuột rat SD

4 chuột rat SD (được mua từ JSJ Experimental Animal Co., Ltd.), 2 con đực và 2 cpm cái được duy trì trong chu trình sáng/tối được điều chỉnh ở 12/12 giờ, với nhiệt độ không đổi là $24 \pm 3^\circ\text{C}$, độ ẩm là 50-60%, và tự do tiếp cận với thức ăn và nước. Vào ngày làm thí nghiệm, các con chuột rat SD được tiêm tác nhân thử nghiệm vào trong tĩnh mạch đuôi với liều lượng là 3 mg/kg và thể tích tiêm là 5 ml/kg.

Thời gian lấy máu: Vào ngày dùng thứ nhất, máu được lấy từ tĩnh mạch đáy mắt sau 5 phút, 8 h, 24 h, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 8 ngày, và 15 ngày sau khi dùng, 200 μL mỗi lần (tương đương với 100 μL huyết thanh); Đặt các mẫu máu thu thập được ở nhiệt độ trong phòng trong nửa giờ cho tới khi máu đông, và sau đó ly tâm ở $10.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C . Thu thập phần nổi và bảo quản ngay lập tức ở -80°C . Nồng độ kháng thể B7-H3 này trong huyết thanh được đo bằng ELISA, và thực hiện phân tích PK. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. $T_{1/2}$ của kháng thể B7-H3 trong chuột rat SD

Tác nhân được thử nghiệm	Đường dùng	$T_{1/2}$ (trung bình $\pm$ SD, h)
h1702	IV (3 mg/kg)	185 ± 17

Các kết quả này cho thấy rằng thời gian bán hủy của kháng thể theo sáng chế trong chuột rat là khoảng 185 h (7,7 ngày).

Ví dụ thử nghiệm 7. Độ ổn định vật lý của kháng thể B7-H3

DSC được sử dụng để phát hiện độ ổn định nhiệt của các kháng thể khác nhau, và độ ổn định nhiệt này trong các hệ thống đệm khác nhau dưới các điều kiện pH khác nhau được so sánh. Các hệ thống đệm điển hình tương ứng với các pH khác nhau là 10 mM PB (pH 7) và 10 mM Axetat (pH 5,2). Hòa tan mẫu này trong đệm tương ứng, và

nồng độ mẫu được kiểm soát ở khoảng 1mg/ml. Phát hiện được thực hiện sử dụng MicroCal* VP-Capillary DSC (Malvern). Trước khi phát hiện, mỗi mẫu và đệm trống được tách khí bằng thiết bị tách khí chân không trong từ 1 đến 2 phút. 400 μ l mẫu hoặc đệm trống được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa mẫu (nạp thiết bị là 300 μ l). Hai cặp cuối cùng của các đĩa lỗ được bổ sung tương ứng với là Decon 90 14% và ddH₂O để làm sạch. Sau khi nạp đĩa mẫu này, tấm phủ nhựa mềm được đặt lên. Nhiệt độ quét bắt đầu từ 25°C và kết thúc ở 100°C. Tốc độ quét là 60°C/h. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8. Trong một vài hệ thống thử nghiệm, cả hai h1702 và h1703 thể hiện độ ổn định nhiệt tốt.

Bảng 8. Các kết quả DSC của các kháng thể khác nhau

Mẫu	Đệm	Tm-bắt đầu (°C)	TM (°C)
h1702	pH7,0	65,82	77,51
	pH 5,2	65,59	78,97
h1703	pH7,0	61,33	73,19
	pH 5,2	60,65	75,71

Độ tinh khiết của mẫu này được theo dõi bằng SEC-HPLC để kiểm tra độ ổn định dưới điều kiện nồng độ nhất định. Như ví dụ về điều kiện, nồng độ mẫu được kiểm soát ở khoảng 40-50 mg/ml. Độ ổn định của các kháng thể khác nhau được so sánh trong hệ thống PBS (pH 7,4) và hệ thống axit axetic/sucroza pH 5,2 ở 4°C, 30°C, 40°C trong một tháng bảo quản. Độ tinh khiết của kháng thể được kiểm tra sử dụng cột HPLC protein Xbridge BEH SEC 200A (Waters). Sau một tháng kiểm tra, cả hai h1702 và h1703 thể hiện độ ổn định tốt. Các kết quả được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9. Các kết quả về độ ổn định cho các kháng thể khác nhau

Mẫu	4°C/tháng/độ tinh khiết	30°C/tháng/độ tinh khiết	40°C/tháng/độ tinh khiết
-----	-------------------------	--------------------------	--------------------------

h1702/ axit axetic	99,25%	98,68%	97,85%
h1702/PBS	99,21%	98,07%	96,34%
h1703/ axit axetic	99,31%	99,04%	98,38%
h1703/PBS	99,18%	98,56%	96,99%

Các kết quả này cho thấy rằng cả hai h1702 và h1703 thể hiện độ ổn định tuyệt vời trong cả hai đệm axit axetic và PBS.

Ví dụ thử nghiệm 8. Độ ổn định hóa học của kháng thể B7-H3

Sự thay đổi hóa học sau khi điều chế hóa học là một trong những lý do thông thường dẫn đến vấn đề về độ ổn định của sản phẩm, đặc biệt là mức độ khử nhóm amin, sự oxy hóa hoặc sự thay đổi isome hóa ở một số gốc axit amin trong vùng CDR. Các sự thay đổi này nên được tránh hoặc giảm bớt. 500 µg kháng thể được thử nghiệm được hòa tan trong 500 µl PBS pH 7,4, và được đưa sang bể nước ở 40°C; lấy các mẫu ở các ngày 0, 10, và 20, cho các thí nghiệm thủy phân bằng enzym. 100 µg mẫu được lấy ở các thời điểm khác nhau và hòa tan trong 100 µl dung dịch 0.2 M His-HCl, 8 M Gua-HCl, pH 6,0; bổ sung 3 µl 0,1 g/mL DTT, và được đưa sang bể nước ở 50°C trong 1 giờ; sau đó, siêu lọc các mẫu này hai lần bằng dung dịch 0,02 M His-HCl, pH 6,0, và bổ sung 3 µL 0,25 mg/mL trypsin. Thủy phân hỗn hợp này qua đêm ở 37°C trong bể nước. Các vị trí thay đổi tiềm tàng được phân tích bằng máy đo phổ khối (các kết quả được thể hiện trong bảng 10) sử dụng Agilent 6530 Q-TOF. Các kết quả này cho thấy rằng h1702 và h1703 được mô tả trong sáng chế này không có xu hướng gia tăng đáng kể về sự khử nhóm amin, sự oxy hóa hoặc tính không đồng nhất, cho thấy rằng các phân tử này có độ ổn định hóa học tuyệt vời.

Bảng 10. Độ ổn định hóa học của các kháng thể khác nhau

Mẫu	LC/HC	Vị trí/thay đổi	D0	D10	D20
h1702	LC	M48/ ôxi hóa	2,82%	2,9%	2,83%
	HC	M34/ ôxi hóa	3,52%	3,46%	3,38%

		M83/ ôxi hóa	0,98%	1,01%	0,01%
h1703	HC	M34/ ôxi hóa	1,93%	2,62%	2,16%
		M83/ ôxi hóa	1,96%	2,62%	2,8%

Ví dụ thử nghiệm 9. Độ ổn định của kháng thể h1702-1

Chuỗi nhẹ kiểu lambda có nhiều hơn một axit amin S ở đầu tận cùng C so với kiểu kappa, và sự cản trở không gian của S có thể là yếu tố gây ra sự không ổn định của liên kết disulfit bên trong chuỗi giữa chuỗi nhẹ và nặng. Axit amin S tận cùng có thể được loại bỏ bằng tách đơn tính dòng phân tử, và độ ổn định của kháng thể dưới điều kiện kiểm sẽ được cải thiện đáng kể.

Khi axit amin thứ nhất ở đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ là kháng thể trần là Q, sự tạo vòng một phần sẽ cũng xảy ra trong kháng thể này, và dẫn đến gia tăng tính không đồng nhất về điện tích của mẫu, ảnh hưởng đến tính không ổn định của công thức và sản phẩm. Axit amin thứ nhất Q ở đầu tận cùng N được gây đột biến thành D bằng tách dòng đơn tính phân tử để loại bỏ sự đóng vòng không hoàn toàn và cải thiện đáng kể tính ổn định của kháng thể này. Sự thay đổi trên không ảnh hưởng đáng kể đến ái lực của kháng thể tái tổ hợp bằng công nghệ di truyền với kháng nguyên của nó.

Độ ổn định của h1702 và h1702-1 được thử nghiệm bằng phương pháp phân tích SEC, CE-SDS không khử (pH 9,0) và IEX.

Phát hiện SEC: Sắc ký Waters e2695 và cột Xbridge BEH 200A SEC đã được sử dụng. Nạp 50 µg kháng thể, và thực hiện rửa giải sử dụng pha di động PBS trong gradient cố định.

Phương pháp CE-SDS NR:

Các mẫu được xử lý sử dụng Kit phân tích Beckman SDS-MW. Bổ sung dung dịch đệm vào 100 µg kháng thể được thử nghiệm được biến tính bằng cách gia nhiệt trong đệm mẫu như được mô tả trong quy trình. Thu thập dữ liệu sử dụng thiết bị điện di mao mạch PA800.

Phương pháp IEX:

Sắc ký Waters Acquity H-Class và cột Thermo MAbPac SCX-10 được sử dụng. Nạp 50 µg kháng thể được thử nghiệm, và áp dụng gradient tuyến tính, sử dụng Kit đệm gradient pH CX-1 làm pha động; tín hiệu cực tím ở chiều dài 280 nm được thu thập.

Bảng 11. So sánh độ ổn định của h1702 và h1702-1

	SEC	CE-SDS (pH9.0)	IEX
h1702	100%	71,21%	40,5%
h1702-1	100%	94,67%	86,21%

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết bằng các Fig. và các phương án đặc hiệu để hiểu rõ ràng, bản mô tả và các phương án không nên được hiểu làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả nội dung của các tài liệu và tài liệu patent được viện dẫn ở đây được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, liên kết với B7-H3 người, bao gồm:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, 14 và 15;

(ii) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, 17 và 18; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19, 20 và 21.

2. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng là kháng thể tái tổ hợp.

3. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng là kháng thể tái tổ hợp người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

4. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó các trình tự vùng khung (FR) của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người tái tổ hợp được bắt nguồn tương ứng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ dòng mầm người, hoặc trình tự đột biến của nó.

5. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể người tái tổ hợp chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 8 hoặc biến thể của nó; trong đó biến thể này có sự mất, sự thay thế hoặc sự bổ sung 1-10 axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 8.

6. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể người tái tổ hợp chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc 9 hoặc biến thể của nó; trong đó biến thể này có sự mất, sự

thay thế hoặc sự bổ sung 1-10 axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc 9.

7. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng chứa thêm vùng hằng định kháng thể người.

8. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng là kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22 và 23, hoặc kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22 và 26, hoặc kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 24 và 25.

9. Kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó đoạn liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂ và kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V dime hóa (diabody), và vùng V được ổn định bằng liên kết disulfua (dsFv).

10. Dược phẩm chứa khối lượng hữu hiệu để điều trị bệnh kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

11. Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

12. Vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic theo điểm 11.

13. Tế bào chủ được biến nạp vector tái tổ hợp theo điểm 12, trong đó tế bào chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào tiền nhân và tế bào nhân chuẩn.

14. Tế bào chủ theo điểm 13, trong đó tế bào chủ này là tế bào động vật có vú hoặc tế bào nấm men.

15. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 13 trong dịch nuôi cấy để tạo thành và tích tụ kháng thể kháng B7-H3 đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, và

thu hồi kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được tích tụ từ dịch nuôi cấy này.

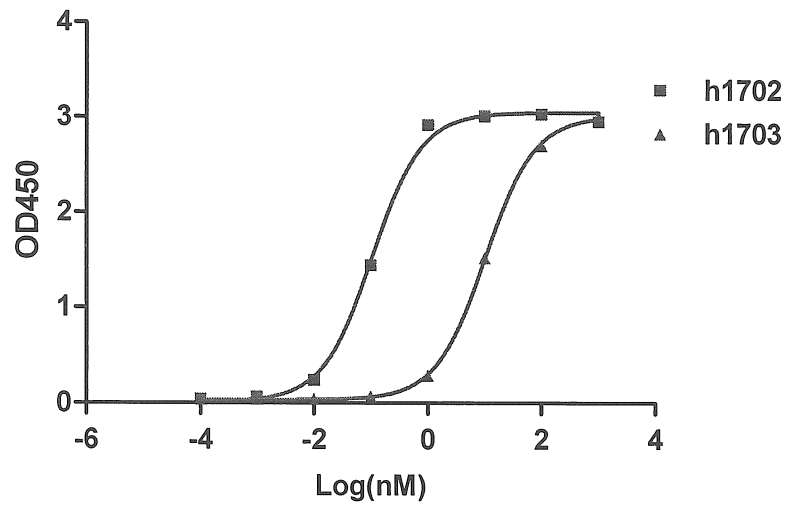


Fig. 1

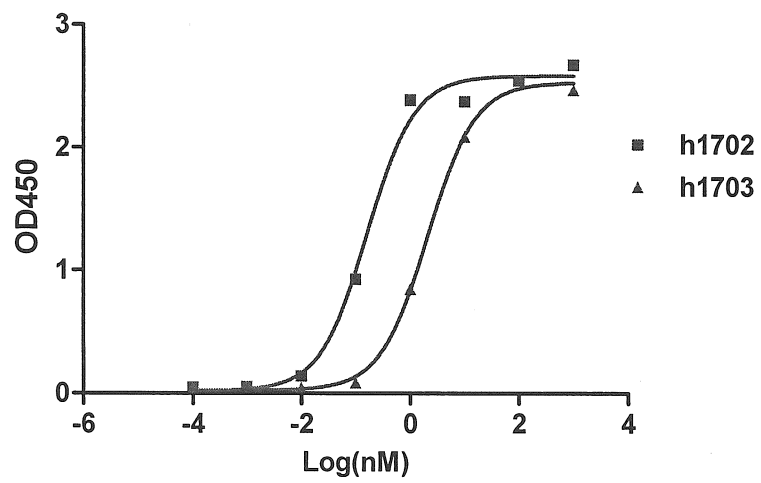


Fig. 2

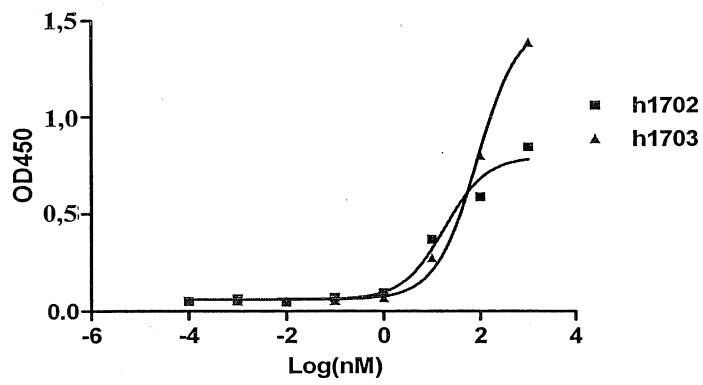


Fig. 3

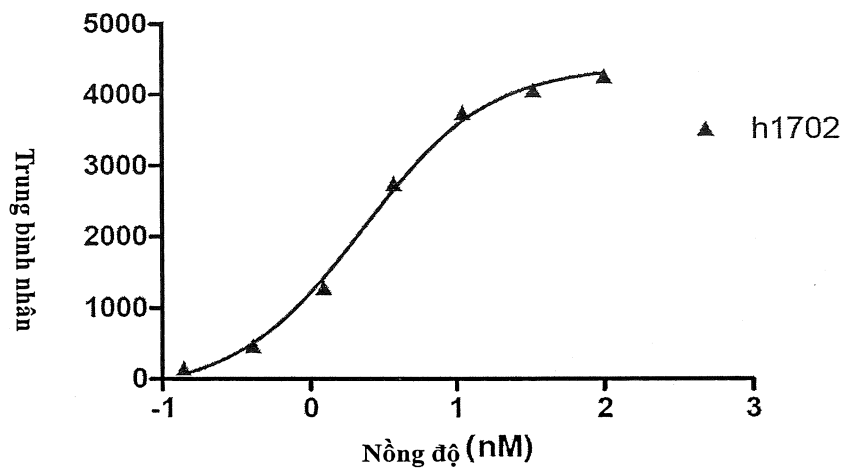


Fig. 4

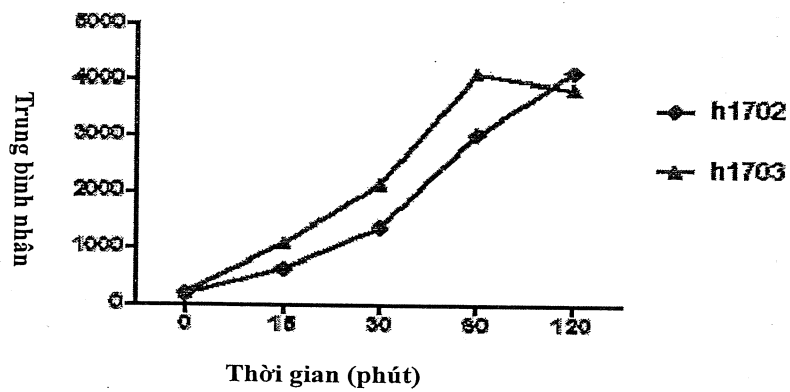


Fig. 5

Danh mục trình tự

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.,LTD; SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO.,LTD

<120> KHÁNG THỂ B7-H3 HOẶC MÀNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ B7-H3 HOẶC MÀNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ

<130> 780019CPCT

<160> 26

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 534

<212> PRT

<213> Người

<220>

<221> PEPTIT

<223> Trình tự axit amin có chiều dài hoàn chỉnh B7H3 người

<400> 1

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

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

<210> 2
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Chuột *Mus musculus*

<220>
 <221> PEPTIT
 <223> Trình tự axit amin có chiều dài hoàn chỉnh B7H3 chuột

<400> 2
 Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val Cys Val Arg Thr
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala Val Glu Val Gln
 20 25 30

```

Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr Asp Ala Thr Leu
    35              40              45
Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
    50              55              60
Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr
    65              70              75              80
Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg Thr Ala Leu Phe
              85              90              95
Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
    100              105              110
Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser Ile Gln Asp
    115              120              125
Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
    130              135              140
Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asn Met
    145              150              155              160
Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
              165              170              175
Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
    180              185              190
Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
    195              200              205
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
    210              215              220
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
    225              230              235              240
Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
              245              250              255
Val Cys Leu Val Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
    260              265              270
Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
    275              280              285
Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro Leu Lys Pro
    290              295              300
Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
    305              310              315

```

```

<210> 3
<211> 223
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> PEPTIT
<223> Kháng nguyên B7H3 người: 2Ig-B7H3

```

```

<400> 3
Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1              5              10              15
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
    20              25              30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
    35              40              45

```

```

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

```

<210> 4
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> PEPTIT
 <223> Kháng nguyên B7H3 người: 4Ig-B7H3

```

<400> 4
Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1                      5                      10                      15
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
                      20                      25                      30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
                      35                      40                      45
His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
 50                      55                      60
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65                      70                      75                      80
Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val
                      85                      90                      95
Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
                      100                    105                    110
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
                      115                    120                    125
Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
                      130                    135                    140
Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
145                      150                    155                    160

```



```

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

```

```

<210> 5
<211> 222
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> PEPTIT
<223> Kháng nguyên B7H3 chuột

```

```

<400> 5
Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr
1      5      10      15
Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
      20      25      30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
      35      40      45

```

```

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

```

```

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> KHU VỰC
<223> h1702 Vùng biến đổi chuỗi nặng

```

```

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser
          20          25          30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val 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 Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

```

<210> 7
<211> 110
<212> PRT

```

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702 vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 7

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

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1703 Vùng biến đổi chuỗi nặng

<400> 8

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

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1703 vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 9

```

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

```

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702 HCDR1

<400> 10

```

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser Ala
1           5

```

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702 HCDR2

<400> 11

```

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1           5

```

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702 HCDR3

<400> 12

Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702 LCDR1

<400> 13

Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser His Tyr
1 5

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702 LCDR2

<400> 14

Asn Thr Asn
1

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> h1702 LCDR3

<400> 15

Ala Ile His Val Asp Arg Asp Ile Trp Val
1 5 10

<210> 16

<211> 8

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 HCDR1

<400> 16
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 HCDR2

<400> 17
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 HCDR3

<400> 18
 Ala Lys Gly Val Gly Pro Val His Ala Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 LCDR1

<400> 19
 Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 20
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 LCDR2

<400> 20
 Ala Val Ser
 1

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 LCDR3

<400> 21
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Met Trp Thr
 1 5 10

<210> 22
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1702-IgG1 chuỗi nặng

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val 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 Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[illegible]

```
<210> 23
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<221> KHU VỰC
<223> h1702 chuỗi nhe

<400> 23

```

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

```

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1703-IgG1 chuỗi nặng

<400> 24

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Tyr 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 Gly Val Gly Pro Val His Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly

```

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

Lys

<210> 25
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> KHU VỰC
 <223> h1703 chuỗi nhẹ

<400> 25

```

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

```

<210> 26

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> KHU VỰC

<223> h1702-1 chuỗi nhẹ

<400> 26

```

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

```

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