



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0039073

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; G01N (13) B
33/574; C07K 16/30; A61K 39/00; A61P
35/00

(21) 1-2019-02936

(22) 14/11/2017

(86) PCT/KR2017/012891 14/11/2017

(87) WO 2018/088877 17/05/2018

(30) 10-2016-0151359 14/11/2016 KR

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/10/2019 379A

(73) Kumho HT, Inc. (KR)

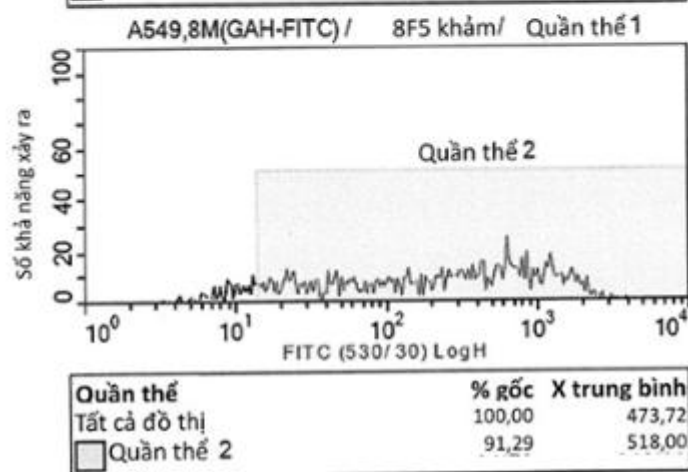
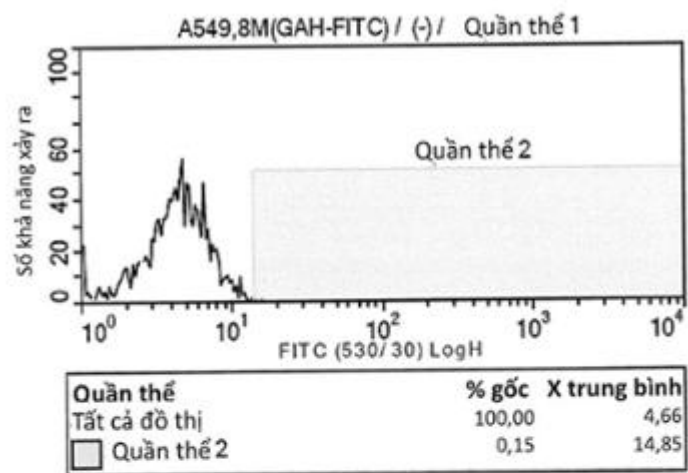
717, Yonga-ro, Gwangsan-gu, Gwangju 62214, Republic of Korea

(72) YOON, Sangsoon (KR); HONG, Kwon Pyo (KR); KIM, Soseul (KR); JI, Gil Yong (KR); LIM, Young Hoon (KR).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD66C, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, VECTƠ TÁI TỔ HỢP VÀ TẾ BÀO TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề cập tới kháng thể kháng CD66c và dược phẩm chứa kháng thể này để điều trị bệnh ung thư, và cụ thể hơn là, có thể gây cảm ứng hoạt hóa tế bào T hoặc đáp ứng miễn dịch thể dịch bằng cách sử dụng kháng thể nhận biết đặc hiệu CD66c. Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vectơ bao gồm phân tử axit nucleic này, tế bào chủ và kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng để làm giảm nhẹ, ngăn ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán bệnh có liên quan đến CD66c.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới kháng thể kháng CD66c và sử dụng kháng thể này để điều trị bệnh ung thư, và cụ thể hơn là, có thể gây cảm ứng hoạt hoá tế bào T hoặc đáp ứng miễn dịch thể dịch bằng cách sử dụng kháng thể nhận biết đặc hiệu CD66c. Kháng thể nhận biết đặc hiệu CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vector bao gồm phân tử axit nucleic và tế bào chủ được sử dụng để làm giảm nhẹ, ngăn ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán bệnh có liên quan đến CD66c, ví dụ bệnh ung thư rắn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết là tỷ lệ sống sót 5 năm của bệnh ung thư phổi vượt quá 80 % nếu bệnh ung thư phổi được phát hiện sớm ở giai đoạn IA (Mulshine, J.L. và Sullivan, D.C. Clinical practice. Lung cancer screening. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352:2714-2720). Do đó quan trọng là tìm được các chất đánh dấu tốt mà có thể phát hiện sớm bệnh ung thư phổi trong khi tìm kiếm các chất đánh dấu sinh học đặc hiệu. Đặc biệt là, bệnh ung thư phổi là một khối u dị thể điển hình, và đáp ứng và tiên lượng là khác nhau cho các cách điều trị khác nhau. Bệnh ung thư phổi có thể chia thành hai loại chính về mặt y học, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC). Bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ có thể được phân chia tiếp thành ung thư phổi biểu mô tuyến, caxinom tế bào vảy và caxinom tế bào lớn.

Trong khi đó, CD66c đã biết là CEACAM6 (phân tử bám dính tế bào có liên quan đến kháng nguyên caxinom phổi 6) hoặc NCA (kháng nguyên glycoprotein phản ứng chéo không đặc hiệu)-90 và có nồng độ cao hơn trong máu của bệnh nhân ung thư phổi, ung thư tụy, ung thư vú, ung thư trực tràng và ung thư gan. CD66c nêu trên là một protein quan trọng cho bám dính tế bào và tham gia vào quá trình bám dính của các tế bào nội mô được hoạt hoá bởi xytokin trong trường hợp bạch cầu trung tính.

Các tế bào bình thường cũng tự tiêu huỷ nếu quá trình bám dính tế bào bị ngăn chặn. Quá trình này gọi là quá trình chết tế bào theo chương trình anoikis. Tuy

nhiên, các tế bào khối u kháng lại anoikis và thúc đẩy sự bùng phát ung thư và do đó gây di căn ung thư. Có thông báo là CD66c ngăn ngừa anoikis, và cũng có thông báo là thay đổi kiểu hình ác tính ở các tế bào ung thư bằng cách điều hoà biểu hiện CD66c. Ngoài ra, khi biểu hiện protein này bị ức chế bằng cách làm câm lặng các gen CD66c bằng cách sử dụng ARN can thiệp nhỏ, quá trình di căn bị ức chế bằng cách tăng cường anoikis *in vivo*. Tóm lại, có thể ngăn ngừa di căn bằng cách ức chế chức năng của CD66c.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với CD66c, và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, vector mang phân tử axit nucleic, và tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic này.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp hoặc kit để phát hiện hoặc chẩn đoán bệnh có liên quan CD66c, bao gồm kháng thể, phân tử axit nucleic, vector, và/hoặc tế bào chủ này.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm để ngăn ngừa, điều trị hoặc giảm nhẹ bệnh có liên quan CD66c, bao gồm kháng thể, phân tử axit nucleic, vector, và/hoặc tế bào chủ, hoặc việc sử dụng kháng thể, phân tử axit nucleic, vector, và/hoặc tế bào chủ để ngăn ngừa, điều trị, hoặc giảm nhẹ bệnh có liên quan cacbonic anhydraza.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp nhằm ngăn ngừa, điều trị hoặc giảm nhẹ bệnh có liên quan CD66c, bao gồm cho một đối tượng mắc bệnh có liên quan cacbonic anhydraza dùng chế phẩm bao gồm kháng thể, phân tử axit nucleic, vector, và/hoặc tế bào chủ này.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm hoặc phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh có liên quan đến di căn ung thư.

Giải pháp kỹ thuật

Sáng chế đề cập tới kháng thể nhận biết và gắn kết với CD66c, phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, vectơ mang phân tử axit nucleic, tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic hoặc vectơ này, và việc sử dụng kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để làm giảm nhẹ, ngăn ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán các khối u rắn dương tính với CD66c.

Cụm biệt hoá 66c (CD66c) là protein đã biết là phân tử bám dính tế bào có liên quan đến kháng nguyên ung thư phôi 6 (CEACAM 6) hoặc kháng nguyên glycoprotein phản ứng chéo không đặc hiệu (NCA)-90 và là protein có vai trò quan trọng cho quá trình bám dính tế bào. CD66c có thể được thể hiện ưu tiên, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự axit amin của SEQ ID No: 1 (Genbank Protein No. AAH05008).

Một phương án đề xuất kháng thể kháng CD66c mà nhận biết đặc hiệu CD66c. Các kháng thể kháng CD66c theo sáng chế gây cảm ứng các đáp ứng miễn dịch thể dịch và qua trung gian tế bào. Kháng thể kháng CD66c theo sáng chế nhận biết đặc hiệu epitop của CD66c (Cụm biệt hoá 66c) và có thể phát hiện hiệu quả kháng nguyên CD66c.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả tách dòng gen của kháng thể từ kháng thể 8F5 của chuột nhắt và biểu hiện kháng thể này dưới dạng kháng thể tái tổ hợp khảm và gắn kết với bề mặt của các tế bào A549 dương tính với kháng nguyên CD66c.

Hình vẽ từ Fig. 2a đến Fig. 2c thể hiện kết quả phân tích HPLC tám loại kháng thể được làm giống người (được nhân hóa) tái tổ hợp được chọn trước tiên trong số 96 loại kháng thể được làm giống người tái tổ hợp. Các kết quả được thể hiện là được đo bên trái ở mật độ quang (OD) 220 nm và được đo bên phải ở OD 280 nm đối với mỗi kháng thể. Kết quả thể hiện có hay không có kết tụ các kháng thể và có hay không có tạp chất từ kháng thể như các mảnh.

Hình vẽ từ Fig. 3a đến Fig. 3e thể hiện mức độ gắn kết bề mặt tế bào tương tự của kháng thể được làm giống người tái tổ hợp so với các kháng thể khảm, do kháng định có gắn kết bề mặt tế bào dương tính với kháng nguyên CD66c của tám

kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chọn trước tiên trong số 96 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp

Hình vẽ Fig. 4a và Fig. 4b thể hiện kết quả phân tích ELISA đối với khả năng gắn kết của năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chọn từ 96 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp với kháng nguyên CD66c. Fig. 4a thể hiện kết quả đối với kháng nguyên CECACAM6 (CD66c) và Fig. 4b thể hiện kết quả đối với kháng nguyên CEACAM1 (CD66a).

Fig. 5a và Fig. 5b thể hiện kết quả khẳng định độ ổn định kháng thể ở điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt đối với năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chọn trong số 96 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp.

Các hình vẽ từ Fig. 6a đến Fig. 6d thể hiện khả năng gắn kết bề mặt tế bào dương tính với kháng nguyên CD66c A549 của kháng thể tái tổ hợp được làm giống người được biểu hiện ở tế bào CHO.

Fig. 7a thể hiện kết quả bài tiết IFN-gamma và perforin do hoạt hoá các tế bào T CD8+ khi kháng thể 8F5 khám được điều trị trong điều kiện đồng nuôi cấy các tế bào LS174T ung thư ruột kết-trực tràng của người và các tế bào T CD8+ của người, và Fig. 7b thể hiện gia tăng chết tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người LS174T, khi điều trị với kháng thể 8F5 khám trong cùng điều kiện như Fig. 7a.

Fig. 8 thể hiện gia tăng chọn lọc chỉ bài tiết IFN-gamma khi kháng thể 8F5 khám được điều trị trong điều kiện đồng nuôi cấy các tế bào T CD8 + và nhiều loại tế bào ung thư, và thể hiện kết quả của tế bào ung thư dạ dày NCI-N87 và tế bào SNU-719 và tế bào ung thư gan PLC/PRF/5.

Các hình vẽ từ Fig. 9a đến Fig. 9c cho thấy kháng nguyên CD66c có thể ức chế hoạt tính tế bào T. Fig. 9a thể hiện kết quả đo nồng độ IFN-gamma nội bào như là một yếu tố cho hoạt tính tế bào T với thiết bị đếm tế bào dòng chảy, và Fig. 9c là kết quả đo mức bài tiết IFN-gamma bằng ELISPOT. Trong trường hợp Fig. 9b và Fig. 9c, khi các kháng nguyên CD66c được cung cấp từ nguồn khác, hoạt tính của tế bào T bị ức chế tương tự.

Fig. 10a và Fig. 10b là kết quả cho thấy kháng thể 8F5 khám gia tăng hoạt hoá tế bào T và gia tăng nhiều loại protein đánh dấu bề mặt tế bào được hoạt hoá như

CD69, CD107, và CD25 trong điều kiện hoạt hoá tế bào T gây ra bởi kháng thể OKT3 gắn với.

Fig. 11a và Fig. 11b cho thấy kháng thể 8F5 khả năng hoạt hoá các tế bào dương tính với CD4 và CD8 trong điều kiện MLR (Phản ứng Lympho bào hỗn hợp), trong đó các tế bào phân nhánh (tế bào có tua) và PBMC được phối trộn với nhau.

Fig. 12a thể hiện kết quả phân tích ELISPOT trong đó có gia tăng bài tiết IFN-gamma, khi kháng thể 8F5 khả năng được điều trị khi đồng nuôi cấy các tế bào ung thư dạ dày của người được phân lập từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư dạ dày với PBMC của người. Fig. 12b và Fig. 12c cho thấy các kết quả tương tự bằng cách thực hiện các thử nghiệm ELISPOT bổ sung trên ba bệnh nhân bị ung thư dạ dày dương tính với kháng nguyên CD66c.

Fig. 13a và Fig. 13b cho thấy có gia tăng biểu hiện của kháng nguyên PD-L1 trên bề mặt của PBMC và các tế bào ung thư A549 bằng cách đồng nuôi cấy với PBMC của người và các tế bào ung thư phối tế bào nhỏ A549 và điều trị kháng thể 8F5 khả năng.

Fig. 14a và Fig. 14b cho thấy là kháng thể được làm giống người tái tổ hợp có các mức độ chức năng kháng thể tương tự bằng cách gia tăng bài tiết IFN-gamma trong dịch đồng nuôi cấy PBMC của người với các tế bào ung thư A549 theo kiểu tương tự với kháng thể 8F5 khả năng.

Fig. 15a và Fig. 15b là kết quả cho thấy kháng thể 8F5 được làm giống người có chức năng gây chết tế bào ung thư, khi đồng nuôi cấy các tế bào ung thư ruột kết-trực tràng LS-174-T hoặc các tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ A549 với PBMC của người.

Các hình vẽ từ Fig. 16a đến Fig. 16g thể hiện kết quả của hiệu lực chống ung thư in vivo bằng cách sử dụng mô hình động vật chuột nhắt NOD / SCID với kháng thể 8F5 khả năng. Fig. 16c thể hiện hiệu lực chống ung thư in vivo bằng cách sử dụng mô hình động vật chuột nhắt NOD / SCID với kháng thể 8F5 được làm giống người. Fig. 16d và từ Fig. 16e đến Fig. 16g thể hiện kết quả của hiệu lực chống ung thư của kháng thể 8F5 được làm giống người bằng cách sử dụng các PBMC của người khác nhau làm các tế bào hiệu ứng (tế bào tác động) ở chuột suy giảm miễn dịch NSG.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ, “kháng thể” nghĩa là chất được sản sinh do kích thích bởi kháng nguyên ở hệ miễn dịch, và loại kháng thể là không bị giới hạn cụ thể. Kháng thể có thể được tạo ra theo cách không phải tự nhiên, ví dụ, được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Kháng thể có thể là kháng thể của động vật (ví dụ, kháng thể của chuột nhắt, v.v.), kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người (được nhân hóa) hoặc kháng thể của người. Kháng thể này có thể là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.

Ngoài ra, trong bản mô tả này, kháng thể có thể được hiểu là bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có khả năng gắn kết kháng nguyên, trừ khi có quy định cụ thể khác. Trong bản mô tả này, thuật ngữ, “các vùng xác định tính hỗ trợ (CDR)” chỉ vùng kháng thể mà mang lại tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể với kháng nguyên trong số các vùng biến đổi của kháng thể này. Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể được mô tả ở trên có thể là mảnh kháng thể bao gồm ít nhất một trong số các vùng xác định tính hỗ trợ.

Phương án của sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà nhận biết đặc hiệu hoặc gắn kết đặc hiệu với CD66c.

Kháng thể kháng CD66c theo sáng chế nhận biết đặc hiệu và/hoặc gắn kết đặc hiệu với CD66c, và kháng thể này bao gồm kháng thể của chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống người. Kháng thể khảm theo sáng chế là kháng thể mà trình tự vùng biến đổi thu được từ một loài và trình tự vùng ổn định là thu được từ các loài khác, ví dụ, trình tự vùng biến đổi thu được từ chuột nhắt và vùng ổn định là thu được từ người. Kháng thể được làm giống người theo sáng chế là kháng thể mà có tính sinh miễn dịch thấp ở người và hoạt tính của kháng thể không phải của người. Ví dụ, có thể điều chế kháng thể bằng cách giữ nguyên vùng CDR không phải của người và thay thế vùng còn lại bằng phần đối ứng của người. Ví dụ, tham khảo: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984) của Morrison và các đồng tác giả; Adv. Immunol., 44:65-92 (1988) của Morrison và Oi; Science, 239:1534-1536 (1988) của Verhoeven và các đồng tác giả; Molec. Immun., 28:489-498 (1991) của Padlan; Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994) của Padlan.

Mảnh kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn, miễn là mảnh này nhận biết

đặc hiệu epitop CD66c và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H). Mảnh này có thể được chọn từ nhóm gồm Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv và CDR. Đặc biệt là, scFv là mảnh kháng thể được điều chế dưới dạng chuỗi đơn bằng cách kết nối vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) bằng polypeptit liên kết.

Ví dụ về kháng thể của chuột nhắt hoặc kháng thể khảm theo sáng chế có thể là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất một phân tử được chọn từ nhóm gồm trình tự axit amin của V_H CDR bao gồm các trình tự axit amin từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 3 và trình tự axit amin của V_L CDR bao gồm các trình tự axit amin từ SEQ ID NO: 4 đến SEQ ID NO: 6. Các CDR và các vùng biến đổi ví dụ của kháng thể của chuột nhắt hoặc kháng thể khảm được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

Cụ thể là, ví dụ về kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm SEQ ID NO: 1 (CDR1), SEQ ID NO: 2 (CDR2) và SEQ ID NO: 3 (CDR3) dưới dạng V_H CDR và/hoặc SEQ ID NO: 4 (CDR1), SEQ ID NO: 5 (CDR2), và SEQ ID NO: 6 (CDR3) dưới dạng V_L CDR.

Kháng thể của chuột nhắt hoặc kháng thể khảm có thể bao gồm vùng V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và vùng V_L bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8.

Sáng chế đề cập tới được phẩm, kit hoặc phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ bệnh ung thư và di căn ung thư, bao gồm kháng thể của chuột nhắt hoặc kháng thể khảm làm thành phần hoạt tính (hoạt chất). Sáng chế cũng đề cập tới được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ bệnh ung thư và di căn ung thư, bao gồm kháng thể của chuột nhắt hoặc kháng thể khảm làm thành phần hoạt tính, ví dụ kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 của kháng thể này được sản sinh bởi tế bào lai được nộp lưu với số truy cập KCLRF-BP-00230. Tế bào lai này được nộp lưu tại Korean Cell Line Research Foundation (KCLRF) ký hiệu '8F5' ngày 22 tháng 2 năm 2010 và nhận số truy cập KCLRF-BP-00230, mà đã được mô tả chi tiết trong KR 10-1214177.

Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư rắn dương tính với CD66c, ví dụ, bệnh

ung thư phổi dương tính với CD66c, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, ung thư vú, hoặc bệnh ung thư tiền liệt tuyến, ưu tiên là bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư dạ dày hoặc bệnh ung thư gan. Việc sử dụng để ngăn ngừa, ức chế, hoặc điều trị bệnh ung thư và di căn ung thư có thể, ví dụ, làm giảm bệnh ung thư rắn hoặc kích cỡ tế bào bệnh ung thư rắn, hoặc gây cảm ứng hoặc thúc đẩy tiêu giảm khối u.

Sáng chế có thể điều chế kháng thể được làm giống người bằng cách sử dụng trình tự axit amin của kháng thể kháng CD66c 8F5 trong kháng thể của chuột nhắt hoặc kháng thể khảm và các trình tự khung của người. Từ các ứng cử viên kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chọn dựa vào mức độ biểu hiện, kết tụ, và mức độ gắn kết tế bào, trong đó thông thường có thể có biểu hiện, kết tụ protein là rất ít do tính không ổn định của bản thân protein, và có khả năng gắn kết tương tự với tế bào dương tính với kháng nguyên đích. Cụ thể là, protein gắn kết tế bào là tương tự protein của kháng thể khảm và thu được bằng cách nhân tỷ lệ dương tính của độ dương tính kháng thể (% bị chặn) với độ huỳnh quang trung bình (trung bình), tiếp đó so sánh với kháng thể khảm để chọn lọc các kháng thể ứng cử trong khoảng $\pm 20\%$ (Ví dụ 2). Do đó, khi các trình tự vùng CDR của kháng thể của chuột được cài vào vùng khung của kháng thể của người ở thời điểm điều chế kháng thể được làm giống người, khả năng gắn kết của kháng thể đã điều chế nhanh chóng giảm đi do thay đổi cấu trúc protein ban đầu. Xét đến giảm khả năng gắn kết của kháng thể đã điều chế, các kháng thể được làm giống người đã chọn của sáng chế là kháng thể rất tốt.

Ưu tiên là, 5 tốp kháng thể được làm giống người tái tổ hợp thể hiện ái lực gắn kết cao dựa trên khả năng gắn kết tế bào so với kháng thể khảm được lựa chọn và cho thử nghiệm gắn kết với kháng nguyên CD66c và kháng nguyên tương tự với kháng nguyên CD66 bằng ELISA.

Ngoài ra, kháng thể được làm giống người theo sáng chế thể hiện độ ổn định tuyệt vời so với kháng thể khảm, ví dụ, kháng thể có độ ổn định mà được phản ánh bằng biến thiên độ phản ứng ANS $< 200\%$. Biến thiên độ phản ứng ANS $< 200\%$ được coi là biến thiên rất nhỏ và giá trị mức biến thiên $> 200\%$ có thể diễn giải là nhận thấy có độ biến thiên ANS do thay đổi cấu trúc đáng kể của protein. Do đó, kháng thể được làm giống người theo sáng chế có hoạt tính gắn kết kháng nguyên

tương tự và khả năng gắn kết tế bào với kháng thể khảm, và độ ổn định vật lý gia tăng của bản thân protein kháng thể, mà có thể rất tốt về mặt chất trị liệu của kháng thể trị liệu.

Biến thiên độ huỳnh quang của kháng thể đối với thuốc thử ANS có thể được đo bằng cách chia mức chênh lệch giữa giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp (ví dụ, 4°C) và giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ cao (ví dụ, 62 °C) cho giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp.

Phương trình toán học

Biến thiên độ huỳnh quang = (giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ cao - giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp) / (giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp)

Cho phương pháp để xác định mức biến thiên độ huỳnh quang đặc hiệu của kháng thể, đo độ phản ứng của thuốc thử ANS bằng thiết bị đọc độ huỳnh quang sau khi để trong 4 giờ ở điều kiện tủ lạnh (4°C) và nhiệt độ 62°C, và được biểu thị là giá trị độ huỳnh quang, và biến thiên độ huỳnh quang có thể thu được bằng cách sử dụng phương trình này.

Các ví dụ về kháng thể được làm giống người theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự axit amin mà quyết định các CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của trình tự từ SEQ ID NO: 9 đến SEQ ID NO: 13. Các ví dụ về kháng thể của chuột và kháng thể khảm mà bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự axit amin mà quyết định các CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin của trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 3 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của trình tự từ SEQ ID NO: 4 đến SEQ ID NO: 6.

Cụ thể là, ví dụ về kháng thể được làm giống người bao gồm trình tự axit amin xác định CDR1 của vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 9, trình tự axit amin xác định CDR2 của vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 10, và CDR3 của vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3.

Các ví dụ về kháng thể được làm giống người bao gồm trình tự axit amin xác định CDR1 của vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 12, trình tự axit amin xác định CDR2 của vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5, và trình tự axit amin xác định CDR3 của vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 13.

Các ví dụ về kháng thể được làm giống người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và từ SEQ ID NO: 14 đến SEQ ID NO: 18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và từ SEQ ID No: 19 đến SEQ ID No: 21, nhưng không bao gồm kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8.

Các trình tự CDR và các trình tự vùng biến đổi theo ví dụ kháng thể được làm giống người được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Tên	Trình tự	SEQ ID NO
8F5-khảm V _H -CDR1	ASGYSFTDYTMN	1
8F5-khảm V _H -CDR2	LINPFHGGTVSNQRFKV	2
8F5-khảm V _H -CDR3	VRGDPVRHYYALAY	3
8F5-khảm V _L -CDR1	GASENVYGTNLN	4
8F5-khảm V _L -CDR2	GATNLAD	5
8F5-khảm V _L -CDR3	VATYYCQNVLSAPYT	6
8F5-khảm V _H	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMNWVKQ SHGKNLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATLTVDVSSNTA YMELLSLTSDDSAVYYCVRGDPVRHYYALAYWGQGTSV TVSS	7
8F5-khảm V _L	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENVYGTNLNHWYQRKQ GKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPD DVATYYCQNVLSAPYTFGGGKLEII	8
8F5-của người V _H -CDR1	ASGYSFTDYTMN	1
8F5-của người V _H -CDR1	ASGYSFTDYTM <u>H</u>	9
8F5-của người V _H -CDR2	INPFHGGTVSNQRFKV	2
8F5-của người V _H -CDR2	LINPF <u>G</u> GST <u>SYAQKFKG</u>	10
8F5-của người V _H -CDR3	VRGDPVRHYYALAY	3
8F5-của người V _L -CDR1	GASENVYGTNLN	4
8F5-của người V _L -CDR1	GASENVYGT <u>L</u> A	11
8F5-của người V _L -CDR1	<u>R</u> ASENVYGTNLN	12
8F5-của người V _L -CDR2	GATNLAD	5

8F5-của người VL-CDR3	VATYYCQNVLSAPYT	6
8F5-của người VL-CDR3	FATYYCQNVLSAPYT	13
8F5-của người-VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISKASGYSFTDYMNWVRQ AHGQNLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATLTVDVSTNTA YMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYYALAYWGQGT LVTVSS	14
8F5-của người-VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISKASGYSFTDYMNWVK QAPGQNLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATLTVDVSTNT AYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYYALAYWGQGT LVTVSS	15
8F5-của người-VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISKASGYSFTDYMNWVR QAPGQGLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATLTVDVSTNT AYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYYALAYWGQGT LVTVSS	16
8F5-của người-VH10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYMNVVK QAPGQNLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATMTVDVSTN TAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYYALAYWGQGT LVTVSS	17
8F5-của người-VH11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISKASGYSFTDYMHWVKQ APGQNLEWIGLINPFHGGTSTYAKFKGRVTMTRDTSTNTA YMELSRLRSDDTAVYYCVRGDPVRHYYALAYWGQGT LVTVSS	18
8F5-của người-VK5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCGASENVYGT LAWYQRKP GKAPKLLIYGATNLADGVPSRFS SGSGSGREYTLTISSLQPD DFATYYCQNVLSAPYTFGGG TKLEIK	19
8F5-của người-VK7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCGASENVYGT LNWYQRKP GKAPKLLIYGATNLADGVPSRFS SGSGSGTEYTLTISSLQPD DFATYYCQNVLSAPYTFGGG TKLEIK	20
8F5-của người-VK8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENVYGT LNWYQRKP GKAPKLLIYGATNLADGMPSRFS SGSGSGTEYTLTISSLQPD DFATYYCQNVLSAPYTFGGG TKLEIK	21

Các trình tự khung của ví dụ kháng thể được làm giống người theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 3 và Bảng 4 dưới đây, trong đó kháng thể này có thể bao gồm ít nhất một phân tử được chọn từ nhóm gồm các khung từ 1 đến 4 của vùng biến đổi chuỗi nặng và các khung từ 1 đến 4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và có thể là kháng thể bao gồm một hoặc nhiều khung.

Cụ thể là, trình tự axit amin của khung 1 của vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm từ SEQ ID NO: 23 đến SEQ ID NO: 27, trình tự axit amin của khung 2 có thể bao gồm từ SEQ ID NO: 32 đến SEQ ID NO: 37, và trình tự axit amin của khung 3 từ SEQ ID NO: 43 đến SEQ ID NO: 47, và trình tự axit amin của khung 4 có thể bao gồm từ SEQ ID NO: 53 đến SEQ ID NO: 57.

Trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trình tự axit amin của khung 1 có thể bao gồm từ SEQ ID No: 29 đến SEQ ID NO: 31, trình tự axit amin của khung 2 có thể bao gồm từ SEQ ID NO: 39 đến SEQ ID NO: 41, và trình tự axit amin của khung 3

có thể tương ứng với trình tự axit amin của trình tự từ SEQ ID NO: 49 đến SEQ ID NO:51, và trình tự axit amin của khung 4 có thể bao gồm trình tự từ SEQ ID NO: 59 đến SEQ ID NO: 61. Các trình tự khung theo các ví dụ về kháng thể được làm giống người được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 2

Tên	FR1	SEQ ID NO	FR2	SEQ ID NO
V _H -Khảm	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCK	22	WVKQSHGKNLEWIG	32
VH5	<u>Q</u> VQLVQSGA <u>E</u> VKKPGASV <u>K</u> I SCK	23	WV <u>R</u> QA <u>H</u> GQ <u>N</u> LEWIG	33
VH6	<u>Q</u> VQLVQSGA <u>E</u> VKKPGASMKI SCK	24	WVKQA <u>P</u> GQ <u>N</u> LEWIG	34
VH7	<u>Q</u> VQLVQSGA <u>E</u> VKKPGASMKI SCK	25	WV <u>R</u> QA <u>P</u> GQ <u>G</u> LEWIG	35
VH10	<u>Q</u> VQLVQSGA <u>E</u> VKKPGASV <u>K</u> Y SCK	26	WVKQA <u>P</u> GQ <u>N</u> LEWIG	36
VH11	<u>Q</u> VQLVQSGA <u>E</u> VKKPGASV <u>K</u> I SCK	27	WVKQA <u>P</u> GQ <u>N</u> LEWIG	37
V _L -Khảm	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	28	WYQRKQKGKSPQLLIY	38
VK5	DIQMTQSP <u>S</u> TLASVGD <u>R</u> VITC	29	WYQRK <u>P</u> GK <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	39
VK7	DIQMTQSP <u>S</u> TLASVGD <u>R</u> VITC	30	WYQRK <u>P</u> GK <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	40
VK8	DIQMTQSP <u>S</u> TLASVGD <u>R</u> VITC	31	WYQRK <u>P</u> GK <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	41

Bảng 3

Tên	FR3	SEQ ID NO	FR4	SEQ ID NO
V _H -Khảm	NQRFKVKATLTVDVSSNTAYMELLSLTSDDSAVYYCVR	42	WGQGTSVTVSS	52
VH5	NQRFKVKATLTVDV <u>S</u> NTAYMEL <u>S</u> R <u>L</u> R <u>S</u> DDTAVYYCVR	43	WGQGT <u>L</u> VTVSS	23
VH6	NQRFKVKATLTVDV <u>S</u> NTAYMEL <u>S</u> R <u>L</u> R <u>S</u> DDTAVYYCVR	44	WGQGT <u>L</u> VTVSS	24
VH7	NQRFKVKATLTVDV <u>S</u> NTAYMEL <u>S</u> R <u>L</u> R <u>S</u> DDTAVYYCVR	45	WGQGT <u>L</u> VTVSS	55
VH10	NQRFKVKAT <u>M</u> TVDV <u>S</u> NTAYMEL <u>S</u> R <u>L</u> R <u>S</u> DDTAVYYCVR	46	WGQGT <u>L</u> VTVSS	56
VH11	<u>A</u> QKFK <u>G</u> RVT <u>M</u> TRDT <u>S</u> NTAYMEL <u>S</u> R <u>L</u> R <u>S</u> DDTAVYYCVR	47	WGQGT <u>L</u> VTVSS	57
V _L -Khảm	GMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDD	48	FGGGTKLEII	58
VK5	G <u>V</u> PSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDD	49	FGGGTKLEI <u>K</u>	59
VK7	G <u>V</u> PSRFSGSGSGT <u>E</u> Y <u>T</u> L <u>T</u> ISSL <u>Q</u> PDD	50	FGGGTKLEI <u>K</u>	60
VK8	GM <u>P</u> SRFSGSGSGT <u>E</u> Y <u>T</u> L <u>T</u> ISSL <u>Q</u> PDD	51	FGGGTKLEI <u>K</u>	61

Kháng thể được làm giống người có thể bao gồm vùng VH được chọn từ nhóm gồm các trình tự axit amin từ SEQ ID NO: 14 đến SEQ ID NO: 18 và vùng VL được chọn từ nhóm gồm các trình tự axit amin từ SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 21. Cụ thể là, các ví dụ về kháng thể được làm giống người bao gồm kháng thể (Vk8 + VH6) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, kháng thể (Vk8 + VH11) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, kháng thể (Vk5 + VH7) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể (Vk7 + VH6) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, kháng thể (Vk7 + VH10) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, kháng thể (Vk7 + VH7) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, kháng thể (Vk7 + VH5) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, và kháng thể (Vk8 + VH7) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21. Các tổ hợp cụ thể và các trình tự axit amin của các kháng thể được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây. Các ví dụ được ưu tiên về kháng thể bao gồm kháng thể (Vk8 + VH6) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, kháng thể (Vk8 + VH11) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, kháng thể (Vk5 + VH7) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể (Vk7 + VH6) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, và kháng thể (Vk7 + VH10) bao gồm vùng VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, và vùng VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20.

Khác với kháng thể của chuột hoặc kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người có độ ổn định gấp 10 lần so với kháng thể 8F5 khảm cũng như khác biệt

về tính gây miễn dịch giảm, khi được dùng cho cơ thể người. Cụ thể là, kháng thể này có độ ổn định cao, được chứng tỏ bởi biến thiên độ huỳnh quang $< 200\%$ do gắn kết ANS ở nhiệt độ cao, ví dụ, ở nhiệt độ $62\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Trong điều kiện nghiêm ngặt cụ thể, kháng thể 8F5 khả thể hiện biến thiên độ phản ứng ANS ở mức $1,406\%$, trong khi kháng thể được làm giống người thể hiện biến thiên tương đối ít ở mức khoảng 114% và 133% , cho thấy là kháng thể được làm giống người được làm ổn định nhờ protein này.

Kháng thể 8F5 khả và các kháng thể được làm giống người gia tăng hoạt hoá tế bào T bằng các yếu tố hoạt hoá tế bào T và gia tăng hoạt tính tế bào T, thậm chí trong điều kiện hoạt hoá tế bào T gây ra bởi hỗn hợp cùng loại các tế bào phân nhánh và các tế bào T thu được từ người khác nhau. Cảm ứng hoạt hoá tế bào T này gây cảm ứng chết các tế bào ung thư, khi tế bào T được đồng nuôi cấy với các tế bào ung thư, và gây cảm ứng hoạt hoá tế bào T trong điều kiện đồng-nuôi cấy nhiều loại tế bào ung thư.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo một phương án của sáng chế thể hiện hoạt tính tiêu giảm khối u và tác dụng ức chế trực tiếp lên các dòng tế bào khối u. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ, “tiêu giảm khối u” là dự định bao gồm gây cảm ứng hoặc thúc đẩy giảm kích cỡ khối u, và/hoặc ức chế, làm gián đoạn, hoặc giảm tăng trưởng tế bào khối u. Giảm kích cỡ khối u nghĩa là, khi cho dùng kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế, kích cỡ khối u giảm đến, ví dụ, $\leq 97\%$, $\leq 95\%$, $\leq 90\%$, $\leq 85\%$, $\leq 80\%$, hoặc $\leq 75\%$ kích cỡ khối u so với trước khi dùng.

Kháng thể theo sáng chế thể hiện cả độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Thuật ngữ “CDR (Vùng xác định tính bổ trợ)” chỉ trình tự axit amin của vùng siêu biến của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt có thể bao gồm ba CDR (CDRH1, CDRH2, CDRH3, và CDRL1, CDRL2, CDRL3). Các CDR của kháng thể có thể cung cấp gốc tiếp xúc thiết yếu cho gắn kết với kháng nguyên hoặc epitop.

Trong toàn bộ bản mô tả này, các thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” hoặc “nhận

biết đặc hiệu” có cùng nghĩa, như nói chung đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, chỉ kháng nguyên và kháng thể tương tác đặc hiệu với nhau và gây đáp ứng miễn dịch.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên,” nghĩa là mảnh có cấu trúc đầy đủ của globulin miễn dịch, mà là polypeptit một phần bao gồm miền mà kháng nguyên có thể gắn kết với. Ví dụ, có thể là scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', hoặc F(ab')₂, nhưng không chỉ giới hạn ở các mảnh này.

Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh của nó có thể được ngẫu hợp với nhiều loại chất đánh dấu, độc tố hoặc được chất chống khối u. Sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là kháng thể của sáng chế có thể ngẫu hợp với chất đánh dấu, độc tố hoặc được chất chống khối u bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Quá trình ngẫu hợp này có thể được tiến hành bằng phương pháp hoá học ở vị trí gắn sau khi biểu hiện kháng thể hoặc kháng nguyên. Theo cách khác, sản phẩm ngẫu hợp có thể được tạo ra bằng thao tác di truyền vào kháng thể hoặc kháng nguyên của sáng chế ở cấp độ ADN. Sau đó, ADN được biểu hiện ở hệ vật chủ thích hợp như mô tả trong bản mô tả này dưới đây, và thu gom các protein đã biểu hiện, và nếu cần, tái tạo tính chất (hồi tính). Quá trình ngẫu hợp có thể đạt được thông qua chất liên kết, đã biết trong lĩnh vực. Cụ thể là, các chất liên kết khác nhau mà giải phóng độc tố hoặc được chất chống khối u trong điều kiện axit hoặc kiềm hoặc khi phơi nhiễm (tiếp xúc) với các proteaza đặc hiệu có thể được sử dụng với công nghệ này. Theo một vài phương án, có thể mong muốn là chất đánh dấu, độc tố hoặc được chất chống khối u được gắn với các nhánh đệm với các độ dài khác nhau để giảm thiểu cản trở về mặt không gian tiềm ẩn.

Chất đánh dấu có thể là được chọn từ nhóm gồm chất đồng vị phóng xạ, hapten, chất huỳnh quang, chất tạo màu, và thuốc nhuộm. Cụ thể là, chất đánh dấu có thể được chọn trong số FLAG, GFP, YFP, RFP, dTomato, cherry, Cy3, Cy5, Cy5.5., Cy7, DNP, AMCA, biotin, digoxigenin, Tamra, Texas Red, rhodamin, Alexa fluors, FITC và TRITC. Theo cách khác, chất đánh dấu có thể là chất đồng vị phóng xạ như, ví dụ, 3H, 14C, 15N, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, hoặc 131I. Các ví dụ khác về chất đánh dấu thích hợp bao gồm các nhóm enzym (ví dụ, peroxidaza củ cải ngựa, galactosidaza củ cải ngựa, luciferaza, phosphataza kiềm), nhóm hoá phát quang, các

nhóm biotiny1, hoặc các epitop polypeptit định trước được nhận biết bởi chất thông báo thứ cấp.

Miễn là có độc tính đối với các tế bào hoặc sinh vật, có thể sử dụng độc tố bất kỳ theo sáng chế. Ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, phân tử nhỏ, peptit, hoặc protein có thể được sử dụng làm độc tố. Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được ngẫu hợp với độc tố để tạo thành protein dung hợp. Làm độc tố protein, có thể sử dụng rixin, saporin, gelonin, momordin, độc tố bạch hầu, hoặc pseudomonas. Làm chất đồng vị phóng xạ, ví dụ bao gồm 131I, 188Rh, và 90Y, nhưng không chỉ giới hạn ở những chất này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất chống khối u" quy định các thuốc có khả năng làm ngừng hoặc làm chậm tăng trưởng bất thường của các mô. Do đó, các chất chống khối u đặc biệt hữu ích trong điều trị bệnh ung thư. Chất chống khối u có thể là chất ức chế sinh mạch, chất xen giữa ADN hoặc chất liên kết ngang ADN, chất ức chế tổng hợp ADN, chất điều hoà phiên mã ADN-ARN, chất ức chế enzym, chất điều hoà gen, chất ức chế vi cấu trúc hình ống (vi ống), hoặc chất chống khối u khác.

Sáng chế còn đề cập tới phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể theo sáng chế. Phân tử axit nucleic của sáng chế, mã hoá kháng thể theo sáng chế, có thể là, ví dụ, ADN, ADN bổ trợ, ARN, ADN được hoặc ARN được sản xuất bằng cách tổng hợp, hoặc phân tử axit nucleic khả năng được sản xuất bằng cách tái tổ hợp bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic, đơn độc hoặc kết hợp. Phân tử axit nucleic cũng có thể là ADN hệ gen tương ứng với toàn bộ gen hoặc phần đáng kể của nó, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của nó. Trình tự nucleotit của phân tử axit nucleic có thể là trình tự nucleotit được cải biến, trong đó có thay thế, khuyết đoạn hoặc thêm đoạn ở một hoặc nhiều gốc nucleotit, và dẫn đến thay thế hoặc đột biến ít nhất một gốc axit amin của trình tự axit amin của kháng thể. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, phân tử axit nucleic là phân tử ADN bổ trợ.

Một phương án của sáng chế cũng đề cập tới vector bao gồm phân tử axit nucleic ở dạng có thể biểu hiện. Vector của sáng chế có thể là, ví dụ, thực khuẩn thể, plasmit, vector virus, hoặc vector retrovirus. Vector retrovirus có thể là có khả năng sao chép hoặc không thể sao chép. Trong trường hợp không thể sao chép, sự nhân lên của virus nói chung xảy ra ở các tế bào/vật chủ bổ trợ.

Phân tử axit nucleic nêu trên có thể được cài vào vectơ sao cho có dung hợp dịch mã với một polynucleotit khác. Nói chung, vectơ có thể có chứa một hoặc nhiều điểm bắt đầu sao chép (ori) và các hệ di truyền để tách dòng hoặc biểu hiện, một hoặc nhiều chất đánh dấu để chọn lọc ở vật chủ, ví dụ, tính kháng kháng sinh, và một hoặc nhiều cat-xet biểu hiện. Các ví dụ về điểm bắt đầu sao chép (ori) bao gồm các điểm bắt đầu sao chép của Col E1, virut SV40 và M 13.

Theo sáng chế, phân tử axit nucleic có thể được thiết kế để đưa vào vật chủ, bằng cách trực tiếp hoặc qua liposom, vectơ thực khuẩn thể, hoặc vectơ virut (ví dụ, vectơ adenovirut, vectơ retrovirut, v.v.). Ngoài ra, các hệ baculovirut, hoặc các hệ dựa vào virut *vaccinia* hoặc *semliki forest* có thể được sử dụng làm các hệ biểu hiện ở sinh vật có nhân điển hình cho các phân tử axit nucleic của sáng chế.

Một phương án khác của sáng chế đề cập tới vật chủ không phải là người bao gồm vectơ của sáng chế. Vật chủ có thể là chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Polynucleotit hoặc vectơ của sáng chế, có mặt trong tế bào chủ, có thể được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ hoặc có thể được duy trì ngoài nhiễm sắc thể.

Ngoài ra, sáng chế đề cập tới động vật chuyển gen không phải là người, để sản xuất kháng thể theo sáng chế, bao gồm một hoặc nhiều phân tử axit nucleic của sáng chế. Các kháng thể có thể được sản xuất và thu hồi từ mô hoặc các dịch cơ thể, như sữa, máu hoặc nước tiểu, từ dê, bò, ngựa, heo, chuột cống, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng (chuột túi má) hoặc động vật có vú khác.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chất nhận biết chọn lọc vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c, và dòng tế bào sản xuất kháng thể nhận biết chọn lọc vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c. Kháng thể cho vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c hoặc mảnh của nó, có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp thông thường với protein CD66c, vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c, một đoạn của CD66c có chứa vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c, hoặc tế bào biểu hiện vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c làm kháng nguyên. Ví dụ, phương pháp để sản xuất kháng thể kháng CD66c có thể đạt được bằng phương pháp sản xuất dòng tế bào sản sinh kháng thể kháng CD66c, bao gồm (a) tiêm và gây miễn dịch cho động vật bằng protein CD66c, vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c, một đoạn của CD66c có chứa vùng xác định tính kháng

nguyên của CD66c, hoặc tế bào biểu hiện vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c, (b) thu tế bào lá lách sản sinh kháng thể đặc hiệu đối với CD66c, và (c) dung hợp các tế bào lá lách với các tế bào u tủy để tạo ra tế bào lai và chọn lọc tế bào lai sản xuất kháng thể kháng CD66c. Kháng thể này có thể được phân lập bằng cách nuôi cấy dòng tế bào in vitro hoặc bằng cách đưa dòng tế bào này vào in vivo. Ví dụ, dòng tế bào này có thể được tiêm trong màng bụng vào chuột nhắt, tiếp đó phân lập và tinh chế kháng thể từ dịch cổ trướng. Phân lập và tinh chế các kháng thể đơn dòng có thể đạt được bằng cách sắc ký trao đổi ion (DEAE hoặc DE52) hoặc sắc ký ái lực dịch nổi nuôi cấy và dịch cổ trướng bằng cách sử dụng cột kháng globulin miễn dịch hoặc cột protein A.

Vùng xác định tính kháng nguyên mà kháng thể của sáng chế gắn kết vào thể hiện khả năng biểu hiện đặc hiệu khối u rắn. Do đó, kháng thể kháng CD66c có thể được sử dụng có hiệu quả không chỉ để phát hiện các tế bào khối u, mà còn có độ đặc tính tế bào chỉ đối với các tế bào khối u khi mang chất có độc tính.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng CD66c, cụ thể là vùng xác định tính kháng nguyên nằm ở miền không có tính xúc tác của CD66c, để phát hiện khối u rắn. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm để phát hiện các tế bào gốc ung thư của các khối u rắn, bao gồm một chất tương tác với vùng xác định tính kháng nguyên. Chất tương tác này có thể là chất bất kỳ có thể tương tác với CD66c, cụ thể là vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c nằm ở miền không có tính xúc tác của nó. Cụ thể là, chất tương tác này có thể được chọn từ nhóm gồm hoá chất phân tử nhỏ, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, aptame, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập tới chế phẩm chẩn đoán, bao gồm kháng thể theo sáng chế, phân tử axit nucleic của sáng chế, vectơ của sáng chế, hoặc vật chủ của sáng chế. Thuật ngữ "chế phẩm chẩn đoán", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ chế phẩm bao gồm ít nhất một trong số kháng thể, phân tử axit nucleic, vectơ, và/hoặc vật chủ của sáng chế.

Chế phẩm chẩn đoán của sáng chế là hữu ích để phát hiện khả năng biểu hiện không mong muốn hoặc biểu hiện quá mức của CD66c ở nhiều loại tế bào, mô hoặc một mẫu thích hợp khác, bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể của sáng chế và

xác định sự có mặt của CD66c trong mẫu. Do đó, chế phẩm chẩn đoán của sáng chế có thể có sẵn để đánh giá sự khởi phát hoặc tình trạng bệnh, như được xác định trong bản mô tả này dưới đây. Cụ thể là, các tế bào ác tính, như các tế bào ung thư có khả năng biểu hiện CD66c có thể là đích nhắm tới của kháng thể của sáng chế, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của nó. Các tế bào mà đã gắn kết kháng thể của sáng chế có thể bị tấn công bởi các chức năng của hệ miễn dịch như hệ bổ thể hoặc bởi độc tính tế bào qua trung gian tế bào, và do đó giảm thiểu số lượng hoặc loại bỏ hoàn toàn các tế bào có biểu hiện không mong muốn hoặc biểu hiện quá mức của CD66c.

Theo một phương án khác, kháng thể của sáng chế, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của nó được ngẫu hợp với chất đánh dấu. Các kháng thể này là đặc biệt hữu ích cho các ứng dụng chẩn đoán.

Chế phẩm chẩn đoán của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng chất có hoạt tính đơn độc hoặc kết hợp với các chất khác.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề cập tới phương pháp để phát hiện tế bào khối u, phương pháp này bao gồm (a) cho kháng thể kháng CD66c phản ứng với mẫu bao gồm tế bào khối u, và (b) xác định xem mẫu có phải là khối u hay không nếu mẫu này dương tính với kháng thể. Mẫu này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dịch lympho bào, tủy xương, máu, và hồng huyết cầu. Tế bào khối u ưu tiên là tế bào ung thư vú, tế bào ung thư phổi, tế bào ung thư dạ dày, tế bào ung thư tiền liệt tuyến, hoặc tế bào ung thư gan.

Khi sử dụng để sàng lọc tế bào khối u, kháng thể kháng CD66c có thể được liên hợp với chất đánh dấu có khả năng chỉ thị độ phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Chất đánh dấu hữu ích cho mục đích này có thể bao gồm đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất tạo sắc (màu), và thuốc nhuộm.

Kháng thể kháng CD66c của sáng chế có thể được cung cấp cho kit để chẩn đoán các khối u rắn.

Kit chẩn đoán có thể bao gồm phương tiện để phát hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể ngoài kháng thể kháng CD66c. Phương tiện phát hiện này có thể là chất hữu ích để thực hiện kỹ thuật được chọn từ nhóm gồm đếm tế bào dòng chảy, nhuộm màu hoá mô miễn dịch, thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym

(ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA), và thử nghiệm miễn dịch phát quang (LIA). Trong ngữ cảnh này, chất đánh dấu có thể là enzym như HRP (peroxidaza củ cải ngựa), chất huỳnh quang như FITC (floresxeinthiocarbamyl etylendiamin), chất phát quang như luminol, isoluminol, và lucigenin, hoặc đồng vị phóng xạ như ^{125}I , ^3H , ^{14}C , và ^{131}I , nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này. Có thể xác định sự liên hợp với chất đánh dấu bằng cách sử dụng phương tiện đo phản ứng enzym với cơ chất, độ huỳnh quang, độ phát quang, hoặc độ phát xạ. Ví dụ, kháng thể kháng CD66c có thể được điều chế để sử dụng trong kit ELISA hoặc kit dải băng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể, phân tử axit nucleic, vectơ, hoặc vật chủ của sáng chế. Kháng thể, phân tử axit nucleic, vectơ, hoặc vật chủ của sáng chế được sử dụng để điều trị hoặc tiêu giảm bệnh ung thư rắn. Việc điều trị hoặc tiêu giảm các khối u rắn có thể đạt được bằng cách cho đối tượng cần điều trị này dùng phân tử axit nucleic, vectơ, hoặc vật chủ của sáng chế ở liều dùng hữu hiệu.

Thuật ngữ, "khối u rắn", như được sử dụng trong bản mô tả này, xác định khối mô bất thường mà thường không có chứa nang hoặc chất lỏng. Khối u rắn có thể là lành tính (nhưng không phải ung thư) hoặc ác tính (thường gọi là ung thư trong lĩnh vực này). Các ví dụ về các khối u rắn mà kháng thể theo sáng chế có thể ứng dụng, bao gồm sacom (ung thư mô liên kết), u thần kinh đệm, khối u ác tính, u trung biểu mô, u lympho, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư ruột kết trực tràng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư tụy, và bệnh ung thư đầu và cổ, và ưu tiên là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư ruột kết, ung thư dạ dày, bệnh ung thư tiền liệt tuyến hoặc bệnh ung thư gan. Ung thư vú có thể là thể ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC), mà có thể được phát hiện là âm tính bằng cách sử dụng ba chất đánh dấu chẩn đoán gồm HER2, thụ thể estrogen (ER), và thụ thể progesteron (PR), và do đó là rất khó phát hiện ra.

Tác dụng trị liệu các khối u rắn theo sáng chế bao gồm tác dụng ức chế đối với quá trình di cư, xâm nhập và di căn của các tế bào ung thư (cụ thể là, các tế bào gốc ung thư) hoặc các mô bao gồm tế bào ung thư, và do đó giảm nhẹ sự ác tính của

bệnh ung thư cũng như ức chế sự tăng trưởng của chúng (giảm về mặt định lượng) và gây chết tế bào theo chương trình.

Để tối đa hoá tác dụng của kháng thể theo sáng chế kết hợp với chất ức chế quai gắn kết PD-1 hoặc PD-L1, gây cảm ứng hoạt hoá tế bào T bài tiết xytokin và gia tăng mức protein PD-L1 trên bề mặt các tế bào ung thư và các tế bào miễn dịch, khi tế bào ung thư và tế bào miễn dịch được đồng nuôi cấy, trong Ví dụ 7. Việc kết hợp này được cho là tạo ra tác dụng chống ung thư mạnh hơn, khi chất ức chế gắn kết PD-1 hoặc PD-L1 được sử dụng kết hợp với kháng thể của sáng chế. Chất trị liệu kháng thể cho PD-1 và PD-L1 làm các chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch đã được cấp phép cho thử nghiệm lâm sàng. Chế phẩm này có thể còn bao gồm chất ức chế gắn kết PD-I hoặc PD-LI.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “đối tượng” hoặc “bệnh nhân” chỉ động vật có vú, bao gồm động vật linh trưởng như người, khỉ, v.v., và động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, v.v. mà có bệnh hoặc có khả năng mắc bệnh khối u rắn hoặc triệu chứng của nó và do đó cần giảm nhẹ, ngăn ngừa, và/hoặc điều trị khối u rắn này.

Sử dụng kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể được thực hiện theo cách chấp nhận được bất kỳ. Ví dụ, chất trị liệu bao gồm kháng thể kháng CD66c là thành phần hoạt tính được sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hoá, và ưu tiên là ngoài đường tiêu hoá, cho một đối tượng, ví dụ, người hoặc động vật mà có các tế bào khối u. Chất trị liệu này có thể bao gồm tá dược được dùng, và liều dùng của chất trị liệu có thể thay đổi tùy thuộc vào tình trạng của bệnh nhân, và có thể nằm trong khoảng từ, ví dụ, 3 mg đến 6.000 mg/ngày. Chất trị liệu có thể có dạng như chất lỏng, bột, nhũ tương, hỗn dịch (huyền phù) hoặc dạng tiêm, nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh bạch cầu tủy hoặc lympho bào cấp hoặc mạn tính, bằng cách sử dụng ít nhất một kháng thể được chọn trong số kháng thể cho vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c, mảnh của kháng thể này (F(ab')₂, Fab, Fv, v.v.), và phối tử cho vùng xác định tính kháng nguyên của CD66c.

Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể là đơn dòng hoặc đa dòng, và có thể thu

được từ người hoặc động vật. Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh của nó có thể còn bao gồm độc tố được mô tả ở trên. Độc tố có thể được dung hợp, ngẫu hợp, liên hợp hoặc liên kết với kháng thể bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết.

Dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng đơn chất hoạt tính hoặc kết hợp với chất khác bất kỳ mà ưu tiên là để điều trị bệnh quan tâm. Ngoài ra, kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp chống ung thư khác, như hoá trị liệu, xạ trị, liệu pháp tế bào, v.v. Nhiều loại chất chống ung thư đã biết có thể được sử dụng trong hoá trị liệu hoặc liệu pháp tế bào.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất phương pháp để sàng lọc chất trị liệu hoặc chất ức chế các khối u rắn, bao gồm cho hợp chất ứng cử tiếp xúc với CD66c, cụ thể là vùng xác định tính kháng nguyên nằm ở miền không có tính xúc tác của CD66c, và phân loại hợp chất ứng cử này là chất trị liệu tiềm năng cho các khối u rắn nếu hợp chất ứng cử này được xác định là gắn kết với vùng xác định tính kháng nguyên. Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất dược phẩm để điều trị các khối u rắn, bao gồm chất trị liệu đã được sàng lọc cho các khối u rắn làm thành phần hoạt tính (hoạt chất).

Hợp chất ứng cử có thể ít nhất là một phân tử được chọn từ nhóm gồm nhiều loại hợp chất tổng hợp hoặc có trong tự nhiên, các polypeptit, các oligopeptit, các peptit hoặc các cấu trúc protein (ví dụ, các kháng thể, các mảnh gắn kết kháng nguyên, các kháng thể peptit, các kháng thể nano, v.v.), các polynucleotit, các oligonucleotit, ARN đối nghĩa, shRNA (ARN cặp tóc ngắn), siRNA (ARN can thiệp nhỏ), các aptame, và các chiết xuất từ các sản phẩm tự nhiên.

Có thể xác định khả năng gắn kết giữa hợp chất ứng cử và vùng xác định tính kháng nguyên bằng cách phát hiện sự tạo thành phức hợp (phức chất), mà có thể thực hiện bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các phản ứng enzym thông thường, huỳnh quang, phát quang và/hoặc phát xạ có thể được phát hiện để khẳng định có gắn kết giữa hợp chất ứng cử với vùng gắn kết kháng nguyên. Chi tiết là, các kỹ thuật sẵn có để phát hiện phức hợp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sắc ký miễn dịch, hoá mô miễn dịch, thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA), thử nghiệm miễn

dịch phát quang (LIA), và thẩm tách Western.

[Các hiệu quả có lợi]

Sáng chế đề xuất kháng thể nhận biết và gắn kết với CD66c, phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể này, vectơ mang phân tử axit nucleic này, tế bào chủ bao gồm vectơ hoặc phân tử axit nucleic này, và việc sử dụng kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để làm giảm nhẹ, ngăn ngừa hoặc chẩn đoán các bệnh có liên quan đến CD66c như các khối u rắn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Có thể hiểu rõ hơn sáng chế thông qua các ví dụ được đưa ra để minh họa mà sẽ không được hiểu là giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế kháng thể khảm kháng CD66c

1.1. Tách dòng trình tự gen của kháng thể kháng CD66c

Gen kháng thể 8F5 được tách dòng bằng cách sử dụng bộ đoạn môi Ig của chuột nhắt (Millipore, Cat. #: 69831). ARN được phân lập từ tế bào lai 8F5 được chạy PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi Ig của chuột nhắt, được cài vào vectơ pGem-T (Promega, Cat. #: A3600), được xác định trình tự để khẳng định trình tự ADN, và gen kháng thể của chuột được nhận diện theo IMGT (www.imgt.org). Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8F5 được phân tích như sau.

Bảng 4

Tên	Trình tự	SEQ ID NO
8F5-khảm V _H -CDR1	ASGYSFTDYTMN	1
8F5-khảm V _H -CDR2	LINPFHGGTVSNQRFKV	2
8F5-khảm V _H -CDR3	VRGDPVRHYALAY	3
8F5-khảm V _L -CDR1	GASENVYGTLN	4
8F5-khảm V _L -CDR2	GATNLAD	5
8F5-khảm V _L -CDR3	VATYYCQNVLSAPYT	6
8F5-khảm V _H	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMNWVKQS HGKNLEWIGLINPFHGGTVSNQRFKVKATLTVDVSSNTAY MELLSLTSDDSAVYYCVRGDPVRHYALAYWGQGTSVTVS	7

	S	
8F5-khảm V _L	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENVYGTNLNWFYQRKQG KSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDV ATYYCQNVLSAPYTFGGGTKLEII	8
8F5-khảm V _H	Gaggtccagctgcaacagctctggacctgaactggggaagcctggagcttcaatgaagatatcc tgcaaggcttctgggtactcattcactgactacacatgaactgggtgaagcagagccatggaa agaaccttgagtggtgacttattaatcctttccatgggtgactgtctccaaccagaggtcaa ggtaaggccacattaactgtagacaagtcaccaacacagcctacatggagctcctcagctg acatctgacgactctcggtctattactgtgaagaggtgacccggcgccattactatgctttg gcctactggggtcagggaacctcagtcaccgtctcctca	62
8F5-khảm V _L	gacatccagatgactcagctctccagctcactgtctgcatctgtgggagaaactgtcaccatcac atgtggagcaagtgagaatgtttacgggtactttaattgggtatcagcggaacagggaatctc ctcagctcctgatctatggtgcaaccaactggcagatggcatgtcatcgaggttcagtggcagt ggttctggtagacagtattctc	63

1-2. Sản xuất kháng thể khảm

Dựa trên trình tự axit amin của kháng thể kháng CD66c của chuột 8F5 đã tạo cấu trúc, điều chế kháng thể khảm kháng CD66c.

1-2-1. Sản xuất plasmid

Để biểu hiện kháng thể khảm kháng CD66c, điều chế tương ứng plasmid cho chuỗi nặng và plasmid biểu hiện chuỗi nhẹ. Sử dụng vectơ POptiVEC (Invitrogen) làm plasmid biểu hiện chuỗi nhẹ, và vectơ pcDNA3.3 (Invitrogen) làm plasmid biểu hiện chuỗi nặng.

Để biểu hiện ADN bổ trợ mã hoá vùng biến đổi và ADN bổ trợ mã hoá vùng ổn định của mỗi kháng thể dưới dạng trình tự axit amin liên tục mà không có cài axit amin bổ sung, tổng hợp trình tự mã hoá vùng biến đổi đã tách dòng và vùng ổn định IgG1 của người đã biết (chuỗi nặng) và các trình tự mã hoá vùng ổn định kappa (chuỗi nhẹ) (Bioneer). Cắt gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã tổng hợp bằng enzym giới hạn Xho I và Sal I và mảnh gen chuỗi nhẹ được nối với vectơ pOptiVec và mảnh gen chuỗi nặng được nối với vectơ pcDNA3.3 để tạo cấu trúc plasmid biểu hiện toàn vẹn (plasmid biểu hiện chuỗi nặng pcDNA3.3-anti-CD66c và plasmid biểu hiện chuỗi nhẹ pOptiVEC-anti-CD66c).

1-2-2. Chuyển nhiễm

Plasmid biểu hiện chuỗi nặng pcDNA3.3-anti-CD66c và plasmid biểu hiện

chuỗi nhẹ pOptiVEC-anti-CD66c đã điều chế được chuyển nhiễm vào các tế bào DG44 thu được từ tế bào CHO (Invitrogen).

Ba ngày trước khi chuyển nhiễm, các tế bào DG44 ở dạng huyền phù được cho thích ứng với môi trường MEMS có chứa 5% FBS để biến đổi chúng thành các tế bào bám dính và cải thiện hiệu suất chuyển nhiễm. Thực hiện chuyển nhiễm trên đĩa 6 giếng (lỗ) bằng cách sử dụng thuốc thử chuyển nhiễm ViaFect (Promega, Cat. #: E4981). Vào ngày trước khi chuyển nhiễm, điều chế các tế bào DG44 đã thích ứng với trạng thái bám dính bằng cách cấy chuyển ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Sử dụng cả pcDNA3.3 của plasmit biểu hiện chuỗi nặng kháng CD66c và pOptiVEC của plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kháng CD66c tương ứng ở 2,0ug và 1,5ug, với tỷ lệ 1,0:0,75 để chuyển nhiễm.

Tiến hành chuyển nhiễm trong 48 giờ. Sử dụng đếm tế bào dòng chảy để phân tích quần thể tế bào đã chuyển nhiễm. Như thể hiện trên Fig. 1, khẳng định có biểu hiện kháng thể khảm bằng dòng tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ A549. Fig. 1 thể hiện kết quả tách dòng gen kháng thể từ kháng thể 8F5 của chuột nhắt và biểu hiện nó ở dạng kháng thể khảm tái tổ hợp và gắn kết với bề mặt của các tế bào A549 dương tính với kháng nguyên CD66c.

Ví dụ 2: Điều chế kháng thể kháng CD66c đơn dòng được làm giống người (được nhân hóa)

2.1 Chọn lọc trình tự kháng thể tái tổ hợp bằng cách làm giống người mô phỏng trên máy tính

Các CDR (CDRH1: ASGYSFTDYTMN) SEQ ID NO: 1, CDRH2: SEQ ID NO: 2 (LINPFHGGTVSNQRFKV); CDRH3: SEQ ID NO: 3 (VRGDPVRHYALAY); CDRL1: SEQ ID NO: 4 (GASENVYGTL); CDRL2: SEQ ID NO: 5 (GATNLAD); nếu CDR3: SEQ ID NO: 6 (VATYYCQNVLSAPYT) của chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt, 8F5 (trình tự axit amin chuỗi nặng: SEQ ID NO: 7, ADN mã hoá chuỗi nặng: SEQ ID NO: 62; trình tự axit amin chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 8; ADN mã hoá chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 63) được duy trì gần với ái lực gắn kết kháng nguyên nhất có thể, hoặc nếu ái lực gắn kết kháng nguyên bằng hoặc lớn hơn, các trình tự kháng thể được làm giống người tái tổ hợp dựa trên trình tự của vùng khung dựa trên trình tự dòng tế bào mầm mã hoá gen kháng thể của

người theo phương pháp mô phỏng bằng máy tính. Gen dòng tế bào mầm của kháng thể của người được sử dụng làm mạch khung của trình tự kháng thể được làm giống người tái tổ hợp là tương tự nhất với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể CD66c của chuột 8F5, tương ứng được thể hiện trong Bảng 5. Trình tự axit amin và trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể CD66c của chuột và các trình tự CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 5

Dòng tế bào mầm Ab của người	
Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ
IGHV1-69-2*01	IGKV1-27*01
IGHV1-2*02	IGKV1-5*01 Homo sapiens
IGHV1-46*01	IGKV1-39*01 Homo sapiens

Chọn lọc 12 vùng biến đổi chuỗi nặng và 8 vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm trình tự kháng thể 8F5 được làm giống người được chọn bằng cách sử dụng trình tự gen dòng tế bào mầm kháng thể của người, như thể hiện trong Bảng 3. Các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, các trình tự CDR, và các trình tự khung của kháng thể được làm giống người đã chọn được thể hiện trong các Bảng từ 6 đến 8. Vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể khảm và kháng thể được làm giống người được thể hiện trong Bảng 1. Ưu tiên là kháng thể của chuột và kháng thể được làm giống người có cùng trình tự axit amin của CDR3 chuỗi nặng và CDR2 chuỗi nhẹ. Phần in đậm và gạch chân trong Bảng 6 là các trình tự CDR của kháng thể. Phần in đậm và gạch chân trong Bảng 7 chỉ axit amin được cải biến.

Bảng 6

Kháng thể số	Kết hợp	Tên	Trình tự axit amin
3043	Vk8+ VH6	VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVKQAPGQNLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFK</u> VKATLTVDVSTNTAYMELSRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>RASENVYGT</u> LNWYQRKPGKAPKLLI

			<u>YGATNLAD</u> GMPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
3058	Vk8+ VH11	VH11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMH</u> WVKQAPGQNLE WIG <u>LINPFHGGTSYAQKFKG</u> RVMTMTRDTSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>RASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GMPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
2938	Vk5+ VH7	VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVRQAPGQGLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFKVK</u> ATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>GA</u> <u>SENVYGT</u> <u>LA</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GVPSRFSGSGSGREYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
3007	Vk7+ VH6	VH6	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVKQAPGQNLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFKVK</u> ATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>GA</u> <u>SENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
3019	Vk7+ VH10	VH10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVKQAPGQNLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFKVK</u> ATMTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>GA</u> <u>SENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
3010	Vk7+ VH7	VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVRQAPGQGLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFKVK</u> ATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>GA</u> <u>SENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
3004	Vk7+ VH5	VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVRQAHGQNLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFKVK</u> ATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>GA</u> <u>SENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u> <u>TFGGGTKLEIK</u>
3046	Vk8+ VH7	VH7	QVQLVQSGAEVKKPGASMKISCK <u>ASGYSFTD</u> <u>YTMN</u> WVRQAPGQGLE WIG <u>LINPFHGGTVSNQRFKVK</u> ATLTVDVSTNTAYMELSRLRSDDTAV YYCVR <u>GDPVRHYYALAY</u> WGQGLTVTVSS
		Vk8	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITC <u>RASENVYGT</u> <u>LN</u> WYQRKPGKAPKLLI <u>YGATNLAD</u> GMPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDD <u>FATYYCONVLSAPY</u>

			TFGGGTKLEIK
--	--	--	-------------

Bảng 7

Tên	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
V _H -khảm	ASGYSFTDYT MN	1	LINPFHGGTVSNQRF KV	2	GDPVRHYYALA Y	3
VH5, 6, 7, 10	ASGYSFTDYT MN	1	LINPFHGGTVSNQRF KV	2	GDPVRHYYALA Y	3
VH11	ASGYSFTDYT <u>MH</u>	9	LINPF <u>GGSTSYAQKF</u> <u>KG</u>	10	GDPVRHYYALA Y	3
V _L -khảm	GASENVYGTL N	4	GATNLAD	5	VATYYCQNVLS APYT	6
VK5	GASENVYGTL <u>A</u>	11	GATNLAD	5	<u>F</u> ATYYCQNVLS APYT	13
VK7	GASENVYGTL N	4	GATNLAD	5	<u>F</u> ATYYCQNVLS APYT	13
VK8	<u>R</u> ASENVYGTL N	12	GATNLAD	5	<u>F</u> ATYYCQNVLS APYT	13

Bảng 8

Tên	FR1	SEQ ID NO	FR2	SEQ ID NO	FR3	SEQ ID NO	FR4	SEQ ID NO
V _H - khảm	EVQLQQSGPEL VKPGASMKISC K	22	WVKQSHG KNLEWIG	32	NQRFKVKATLT VDVSSNTAYM ELLSLTSDDSA VYYCVR	42	WGQGTSV TVSS	52
VH5	<u>Q</u> VQL <u>V</u> QSG <u>A</u> E <u>V</u> KKPGAS <u>V</u> KIS CK	23	WV <u>R</u> Q <u>A</u> H G <u>Q</u> NLEWI G	33	NQRFKVKATLT VDV <u>S</u> TNTAYM EL <u>SRLR</u> SDD <u>T</u> A VYYCVR	43	WGQGT <u>L</u> V TVSS	53
VH6	<u>Q</u> VQL <u>V</u> QSG <u>A</u> E <u>V</u> KKPGASMKIS CK	24	WVKQ <u>A</u> P <u>G</u> <u>Q</u> NLEWIG	34	NQRFKVKATLT VDV <u>S</u> TNTAYM EL <u>SRLR</u> SDD <u>T</u> A VYYCVR	44	WGQGT <u>L</u> V TVSS	54
VH7	<u>Q</u> VQL <u>V</u> QSG <u>A</u> E <u>V</u> KKPGASMKIS CK	25	WV <u>R</u> Q <u>A</u> P <u>G</u> <u>Q</u> GLEWIG	35	NQRFKVKATLT VDV <u>S</u> TNTAYM EL <u>SRLR</u> SDD <u>T</u> A VYYCVR	45	WGQGT <u>L</u> V TVSS	55

VH10	<u>Q</u> V <u>Q</u> L <u>V</u> QSG <u>A</u> E <u>V</u> K <u>K</u> P <u>G</u> A <u>S</u> <u>V</u> K <u>V</u> SCK	26	WV <u>K</u> Q <u>A</u> P <u>G</u> <u>Q</u> NLEWIG	36	NQRFKVKAT <u>M</u> TVDV <u>S</u> TNTAY MEL <u>S</u> R <u>L</u> <u>R</u> SDD <u>T</u> AVYYCVR	46	WGQGT <u>L</u> V TVSS	56
VH11	<u>Q</u> V <u>Q</u> L <u>V</u> QSG <u>A</u> E <u>V</u> K <u>K</u> P <u>G</u> A <u>S</u> <u>V</u> K <u>I</u> S CK	27	WV <u>K</u> Q <u>A</u> P <u>G</u> <u>Q</u> NLEWIG	37	<u>A</u> Q <u>K</u> FK <u>G</u> R <u>V</u> T <u>M</u> <u>T</u> R <u>D</u> T <u>S</u> TNTAY MEL <u>S</u> R <u>L</u> <u>R</u> SDD <u>T</u> AVYYCVR	47	WGQGT <u>L</u> V TVSS	57
V _L - khảm	DIQMTQSPASL SASVGETVTIT C	28	WYQRKQG KSPQLLIY	38	GMSSRFSGSGS GRQYSLKISSL HPDD	48	FGGGTKL EII	58
VK5	DIQMTQSP <u>S</u> TL SASVG <u>D</u> RVTIT C	29	WYQRK <u>P</u> G K <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	39	<u>G</u> V <u>P</u> SRFSGSGS GRQYSLKISSL HPDD	49	FGGGTKL E <u>I</u> K	59
VK7	DIQMTQSP <u>S</u> TL SASVG <u>D</u> RVTIT C	30	WYQRK <u>P</u> G K <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	40	<u>G</u> V <u>P</u> SRFSGSGS <u>G</u> T <u>E</u> Y <u>T</u> L <u>T</u> ISSL <u>Q</u> PDD	50	FGGGTKL E <u>I</u> K	60
VK8	DIQMTQSP <u>S</u> TL SASVG <u>D</u> RVTIT C	31	WYQRK <u>P</u> G K <u>A</u> P <u>K</u> LLIY	41	GM <u>P</u> SRFSGSGS <u>G</u> T <u>E</u> Y <u>T</u> L <u>T</u> ISSL <u>Q</u> PDD	51	FGGGTKL E <u>I</u> K	61

2.2 Biểu hiện và phân tích kháng thể được làm giống người tái tổ hợp

Các trình tự của kháng thể đã chọn được biểu hiện trong các tế bào 293 ở dạng IgG1 của người bằng cách kết nối tương ứng vùng ổn định chuỗi nặng và vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa IgG1 của người. 7 ngày sau khi chuyển nhiễm, kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa KanCap A (Kaneca).

Định lượng kháng thể đã tinh chế bằng cách đo ở OD 280 nm và SDS-PAGE. Phân tích độ tinh khiết và sự kết tụ của kháng thể bằng cách phân tích ở 280 nm và 220 nm bằng HPLC sử dụng cột loại trừ kích cỡ Sepax Zenix-C SEC-300 (Sepax Technologies) (Fig. 2A đến Fig. 2C)

2.3 Phân tích gắn kết tế bào và gắn kết kháng nguyên của kháng thể được làm giống người tái tổ hợp

2-3-1 Thử nghiệm gắn kết tế bào

Lần lượt 96 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp đã biểu hiện được cho vào và cho phản ứng trong ống nghiệm có chứa cùng lượng (1 ug) của dòng tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ A549 dương tính với CD66c ở 4°C trong 30 phút,

rửa bằng PBS, và xử lý bằng kháng thể dê kháng IgG người được liên hợp với FITC (DiNona Inc, Hàn Quốc) được thêm vào và ủ ở 4°C trong 15 phút. Rửa khi rửa bằng PBS, phân tích các tế bào bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy (Stratedigm, S1000EXi) và kết quả được thể hiện dưới đây.

Trong số 96 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp ứng cử, đầu tiên chọn 8 kháng thể dựa trên mức độ biểu hiện, có kết tụ, và mức độ gắn kết tế bào (Bảng 9 và Bảng 10, Fig. 3A đến Fig. 3E). Bảng 9 và Bảng 10 là kết quả phân tích kháng thể kháng CD66c được làm giống người được chọn cấp một và 8F5 khảm, và Bảng 10 thể hiện kết quả phân tích đếm tế bào dòng chảy.

Bảng 9

Số	#71	#86	#93	#43	#51	#45	#41	#74
Protein ID	3043	3058	2938	3007	3019	3010	3004	3046
Kết hợp H & L	Vk8+V H6	Vk8+V H11	Vk5+V H7	Vk7+V H6	Vk7+V H10	Vk7+V H7	Vk7+V H5	Vk8+V H7
Giếng (lỗ)	F11	H2	H9	D7	E3	D9	D5	G2
OD 280nm	3,54	3,86	3,32	4,01	4,03	3,5	3,56	3,54
Thể tích (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Nồng độ (mg/ml)	2,52	2,71	2,36	2,85	2,86	2,49	2,53	2,52
Hiệu số (mg)	0,66	0,71	0,61	0,74	0,74	0,65	0,66	0,66
Hệ số dập tắt	102190	103680	102190	102190	102190	102190	102190	102190
Phân tử lượng (Da)	72750	72691	72616	72633	72521	72604	72669	7272

Bảng 10

Số	Protein ID	Kết hợp H & L	% bị chặn	Trung bình	% (% bị chặn x trung bình)
Kháng thể khảm	**	**	73	619	100,0
#71	3043	Vk8+VH6	69	686	104,8
#86	3058	Vk8+VH11	72	645	102,8

#93	2938	Vk5+VH7	71	611	96,0
#43	3007	Vk7+VH6	71	565	88,8
#51	3019	Vk7+VH10	70	561	86,9
#45	3010	Vk7+VH7	70	554	85,8
#41	3004	Vk7+VH5	71	541	85,0
#74	3046	Vk8+VH7	71	523	82,2

Bảng 9 thể hiện mức độ biểu hiện, có hoặc không có kết tập, và mức độ gắn kết tế bào của 8 kháng thể đã chọn. Cụ thể là, mức biểu hiện và phân tử lượng của 8 kháng thể đã chọn được tóm tắt lại. Ngoài ra, theo kết quả đếm tế bào dòng chảy trong Bảng 10, đã khẳng định là 8 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp thể hiện cường độ gắn kết tế bào $\pm 20\%$ mà thể hiện cường độ gắn kết tế bào rất giống với các kháng thể khảm. Do đó, 8 kháng thể thông thường được biểu hiện và có rất ít thể kết tụ được tạo thành do bản thân protein không ổn định, và ái lực gắn kết tương tự với các tế bào dương tính với kháng nguyên đích so với kháng thể khảm trước tiên được chọn từ 96 kháng thể ứng cử được làm giống người.

Như thể hiện trên Fig. 3, profin gắn kết tế bào trên thực tế là tương tự với profin của kháng thể khảm, và 8 loại kháng thể được làm giống người được xác định bằng cách nhân độ dương tính kháng thể (% bị chặn) với độ huỳnh quang trung bình (trung bình), và bằng cách chọn lọc các kháng thể được làm giống người trong khoảng 20% so với kháng thể khảm. Nói chung, khi trình tự vùng CDR của kháng thể chuột được cài vào vùng khung của kháng thể được làm giống người ở thời điểm sản xuất kháng thể được làm giống người, ái lực gắn kết kháng thể giảm mạnh do thay đổi của cấu trúc protein ban đầu. Xét theo tính chất chung của kháng thể được làm giống người, chọn các kháng thể được làm giống người rất tốt theo sáng chế.

2-3-2 Thử nghiệm gắn kết kháng nguyên

Trong số 8 kháng thể được làm giống người tái tổ hợp đã chọn, năm loại kháng thể được làm giống người tái tổ hợp thể hiện ái lực gắn kết cao hơn so với ái lực của kháng thể khảm được chọn và phân tích ái lực gắn kết với kháng nguyên CD66c và kháng nguyên tương tự CD66 bằng ELISA.

Bảng 11

Protein ID	Kết hợp HC & LC
3043	Vk8+VH6
3058	Vk8+VH11
2938	Vk5+VH7
3007	Vk7+VH6
3019	Vk7+VH10

Phủ kháng nguyên CD66c (CEACAM6; Sino Biological, Inc.) và kháng nguyên CEACAM1 (Sino Biological, Inc.) lên đĩa 96 giếng ở nồng độ 100 ng/giếng và sau đó phong bế. Pha loãng kháng thể cấp một (sơ cấp) theo bậc ba lần từ nồng độ ban đầu 10 ug/ml và để gắn kết ở 37°C trong 1 giờ, và thể liên hợp kháng thể dê kháng Ig người- HRP (Jackson ImmunoResearch) làm kháng thể cấp hai (thứ cấp) được pha loãng 1: 10.000 và ủ ở 37°C trong 30 phút. Rửa ba lần giữa các bước, và thực hiện phản ứng TMB, dừng phản ứng bằng dung dịch H₂SO₄ 1N với cùng lượng dung dịch TMB (100ul) và sau đó đo giá trị OD ở 450nm.

Kết quả của thí nghiệm này là, các ái lực gắn kết với kháng nguyên CD66c của năm loại kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chọn trong số 96 loại kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được thể hiện trên Fig. 4a, trong Bảng 12, trên Fig. 4b và trong Bảng 13. Fig. 4a và Bảng 12 thể hiện khả năng gắn kết của các kháng thể với kháng nguyên CEACAM6 (CD66c), và Fig. 4b và Bảng 13 là kết quả cho kháng nguyên CEACAM1 (CD66a).

Từ ái lực gắn kết của các kháng thể với kháng nguyên trên Fig. 4a, Bảng 12, Fig. 4b và Bảng 13, tất cả các kháng thể đối với CEACAM6 thể hiện profin gắn kết tương tự với kháng thể khảm đối với CEACAM6 và được phân chia thành các nhóm mà không gắn kết hoặc gắn kết CEACAM1 yếu.

Bảng 12

Nồng độ kháng thể (ng/ml)	chi 8F5	hu 3043	hu 3058	hu 2938	hu 3007	hu 3019
10000,00	3,17	2,73	2,87	3,43	3,37	3,13
3333,33	3,41	2,95	3,18	3,27	3,24	3,26

1111,11	3,30	2,74	3,19	3,16	3,23	3,34
370,37	3,30	2,92	2,80	3,08	3,16	3,23
123,46	2,83	2,29	2,22	2,56	2,90	3,04
41,15	2,02	1,73	1,38	1,72	2,17	2,45
13,72	1,15	1,37	1,06	1,15	1,64	1,77
4,57	0,80	0,91	0,74	0,65	1,02	1,32
1,52	0,53	0,70	0,53	0,48	0,79	0,95
0,51	0,41	0,49	0,38	0,36	0,64	0,80
0,17	0,40	0,41	0,37	0,30	0,53	0,68

Bảng 13

Nồng độ kháng thể (ng/ml)	chi 8F5	hu 3043	hu 3058	hu 2938	hu 3007	hu 3019
10000,00	1,21	0,91	0,42	0,32	1,01	0,99
3333,33	1,24	1,22	0,31	0,27	1,15	1,07
1111,11	1,21	1,17	0,19	0,21	1,06	1,02
370,37	1,13	0,80	0,12	0,14	0,92	0,89
123,46	0,95	0,70	0,07	0,10	0,82	0,79
41,15	0,82	0,61	0,07	0,07	0,66	0,58
13,72	0,51	0,43	0,05	0,06	0,46	0,41
4,57	0,28	0,27	0,05	0,05	0,27	0,24
1,52	0,16	0,16	0,05	0,05	0,18	0,16
0,51	0,10	0,10	0,04	0,05	0,11	0,11
0,17	0,08	0,08	0,04	0,04	0,09	0,08

2.4 Phân tích độ ổn định của kháng thể được làm giống người tái tổ hợp

Tiến hành thử nghiệm để xác định độ ổn định của các kháng thể bằng cách để năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp của Ví dụ 3.3 được chọn theo profin gắn kết với kháng nguyên và tế bào trong điều kiện nhiệt độ cao.

Xác định độ ổn định bằng cách tiến hành thử nghiệm gắn kết sử dụng axit 8-anilino-1-naphtalensulfonic (ANS, Sigma). ANS là hợp chất mà có thể phát hiện sự biến tính của các protein bằng cách đo mức thay đổi bước sóng huỳnh quang giữa gắn kết với và không gắn kết với các vị trí kỵ nước bị bộc lộ khi protein bị biến tính.

Kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được điều chỉnh đến nồng độ 0,2 mg/ml bằng cách sử dụng PBS (nước muối đệm phosphat), và để ở 50°C trong 4 giờ trong điều kiện khắc nghiệt. Trộn 0,2 µg/ml dung dịch ANS ở 20 µl với 500 µl dung

dịch kháng thể đã pha loãng làm dung dịch phân tích để đo, và phân tích sau 5 phút sau đó bằng thiết bị đọc huỳnh quang ở bước sóng kích thích 360 nm và bước sóng phát xạ 460 nm. Ngoài ra, đo phản ứng của thuốc thử ANS ở nhiệt độ 70 °C thêm 30 phút.

Fig. 5a và Fig. 5b thể hiện kết quả khẳng định độ ổn định kháng thể của năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 11 trong điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt. Nghĩa là, độ phản ứng của thuốc thử ANS được đo bằng độ huỳnh quang sau khi để kháng thể ở 50°C trong 4 giờ trong điều kiện nghiêm ngặt, và để tiếp ở 70°C trong 30 phút. Như thể hiện kết quả của thử nghiệm trên Fig. 5a, phần lớn năm loại kháng thể thể hiện đáp ứng ANS rất ít khi các kháng thể này được để ở nhiệt độ 50°C trong 4 giờ, nhưng giá trị độ huỳnh quang của các kháng thể này gia tăng đáng kể khi các kháng thể này được để thêm ở 70°C trong 30 phút. Trong số các kháng thể này, kháng thể tái tổ hợp có protein ID: 3058 thể hiện giá trị độ huỳnh quang gia tăng nhỏ nhất, và do đó thể hiện tính chất ổn định nhất khi thay đổi nhiệt độ trong số năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp.

Để đo tốc độ thay đổi của độ phản ứng của thuốc thử ANS, phân tích độ phản ứng của thuốc thử ANS bằng thiết bị đọc huỳnh quang theo cách như trên sau khi để kháng thể trong 4 giờ ở điều kiện tủ lạnh ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) và nhiệt độ 62°C. Có thể xác định mức biến thiên giá trị độ huỳnh quang của kháng thể với thuốc thử ANS bằng cách tính mức chênh lệch giữa giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp (ví dụ, 4°C) và giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ cao (ví dụ, 62°C) và chia cho giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp.

Phương trình toán học

Mức biến thiên giá trị độ huỳnh quang = (giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ cao - giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp) / (giá trị độ huỳnh quang đo được ở điều kiện nhiệt độ thấp)

Như thể hiện trên Fig. 5b, để phản ứng trong 4 giờ ở nhiệt độ 62°C mà được tăng từ nhiệt độ (50°C), và tiếp đó khẳng định độ phản ứng của thuốc thử ANS. Năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp và các kháng thể khảm thể hiện rất ít đáp ứng ANS trong điều kiện tủ lạnh, nhưng gia tăng khi nhiệt độ gia tăng. Tuy nhiên, kháng thể 8F5 khảm thể hiện độ phản ứng của thuốc thử ANS gia tăng đến 1.406%

khi duy trì điều kiện nhiệt độ ở 62°C nhưng thể kết tủa xuất hiện là không ổn định. Tuy nhiên, năm kháng thể được làm giống người thể hiện mức biến thiên độ phản ứng của thuốc thử ANS thấp hơn đáng kể so với các kháng thể khảm, và không tạo ra thể kết tủa. Cụ thể là, các kháng thể được làm giống người Protein ID 3019 và Protein ID 3058 có mức biến thiên độ phản ứng của thuốc thử ANS tương ứng là 114% và 133%, và do đó được coi là các kháng thể ổn định nhất. Ý nghĩa của độ phản ứng của thuốc thử ANS gia tăng chỉ gia tăng bậc độ các axit amin kỵ nước nằm bên trong cấu trúc protein, mà có vai trò gây biến tính cấu trúc protein và dẫn đến kết tủa protein, nghĩa là tạo thành thể kết tủa. Kháng thể được làm giống người theo sáng chế được coi là kháng thể ổn định có mức biến thiên độ phản ứng của thuốc thử ANS < 200%. Mức biến thiên độ phản ứng của thuốc thử ANS < 200% được coi là rất thấp, và khi vượt quá mức này, thay đổi đáng kể hơn trong cấu trúc được coi là có nhận thấy độ phản ứng ANS. Do đó, kháng thể được làm giống người theo sáng chế có khả năng gắn kháng nguyên và khả năng gắn kết tế bào tương tự với kháng thể khảm, và độ ổn định vật lý gia tăng của protein kháng thể, các tính chất này là dấu hiệu rất tốt cho khả năng làm thuốc của kháng thể trị liệu.

2.5 Biểu hiện tế bào CHO và phân tích kháng thể được làm giống người tái tổ hợp

Năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chọn trong Ví dụ 2.3 được biểu hiện ở tế bào CHO được sử dụng để biểu hiện hầu hết các kháng thể trị liệu và được phân tích. Trình tự ADN vùng biến đổi chuỗi nhẹ và trình tự ADN vùng biến đổi chuỗi nặng để tạo cấu trúc năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp đã chọn được tiến hành tối ưu hoá codon, tổng hợp, và nối với gen vùng ổn định IgG1 của người bằng phương pháp PCR chồng lắp. Sản phẩm được cắt bằng XhoI và EcoRI và nối vào vector pcDNA3.4 (Life Technology). Bảng 11 thể hiện kết hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng thể được làm giống người được chọn để biểu hiện ở tế bào CHO.

Các trình tự đoạn mỗi ADN được sử dụng cho PCR trên gen vùng biến đổi và vùng ổn định được thể hiện trong Bảng 14 dưới đây.

Bảng 14

Tên đoạn mỗi	Sử dụng	Gen đích	Các trình tự	SEQ ID NO
--------------	---------	----------	--------------	-----------

8F01	mảnh thứ nhất xuôi chiều	VH6, VH7, VH10, VH11	ATTACTCGAGGCCA CCATGAA	64
8F02	mảnh thứ nhất ngược chiều	VH6, VH10, VH11	AGTTGAAGCGCTGC TCACAGTCA	65
8F03	mảnh thứ hai xuôi chiều	VH6, VH10, VH11	GTGAGCAGCGCTTC AACTAAGGG	66
3E04	mảnh thứ hai ngược chiều	VH6, VH7, VH10, VH11	AGTCGAATTCTCAT TTCCCAGGAGAG	67
8F04	mảnh thứ nhất ngược chiều	VH7	AGTTGAAGCAGAAG ACACTGTCA	68
8F05	mảnh thứ hai xuôi chiều	VH7	GTGTCTTCTGCTTCA ACTAAGGG	69
3E01	mảnh thứ nhất xuôi chiều	Vk5, Vk7, Vk8	ATTACTCGAGGCCA CCATGAAGTGGG	70
8F06	mảnh thứ nhất ngược chiều	Vk5, Vk7, Vk8	AACAGTCCGCTTGA TCTCCAGCT	71
3EL02(2)	mảnh thứ hai xuôi chiều	Vk5, Vk7, Vk8	GAGATCAAGCGGAC TGTTGCTGC	72
3E08	mảnh thứ hai ngược chiều	Vk5, Vk7, Vk8	ATTAGAATTCTCAG CACTCGCCGCGG	73

Năm (5) kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được chuyển nhiễm tạm thời bằng cách sử dụng kit hệ biểu hiện ExpiCHO (nhãn hiệu hàng hoá) (ThermoFisher, Cat. No. A29133), và 5 các kháng thể được biểu hiện với dòng tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ dương tính với CD66c A549 và phân tích bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy, như thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 6a đến Fig. 6c. Tất cả năm kháng thể được làm giống người tái tổ hợp thể hiện ái lực gắn kết tương tự với các kháng thể khảm. Giá trị độ huỳnh quang đo được của thiết bị đếm tế bào dòng chảy được chia cho lượng biểu hiện kháng thể của môi trường nuôi cấy CHO để thu được ái lực gắn kết tương đối của kháng thể so với lượng biểu hiện kháng thể, như thể hiện trên Fig. 6d. Do đó, khẳng định được là kháng thể được làm giống người tái tổ hợp được biểu hiện đúng cách ở các tế bào CHO. Ái lực gắn kết của kháng thể này với bề mặt tế bào được xác định là 100%, và mức thay đổi tương đối là như thể hiện trên Fig. 6d.

Ví dụ 3: Hoạt tính tế bào T và gây chết tế bào ung thư bằng kháng thể 8F5

khảm3.1. Phân tích xytokin hoạt tính tế bào T và phân tích khả năng sống sót của tế bào ung thư sau khi đồng nuôi cấy các tế bào T CD8+ và các tế bào ung thư LS174T

Các tế bào T CD8+ được phân lập từ tế bào máu của người bằng cách sử dụng kit làm giàu tế bào T CD8 của người MagniSort (nhãn hiệu đã đăng ký bảo hộ) (Ebioscience, cat. #: 8804-6812-74). 1×10^6 tế bào T CD8+ và 2×10^5 tế bào ung thư ruột kết-trực tràng LS174T được cho vào từng giếng (lỗ) của đĩa 6 giếng và môi trường 10% FBS / RPMI được thêm vào mỗi giếng đến thể tích cuối là 2 ml trong mỗi giếng và được nuôi cấy. Ở thời điểm này, kháng thể 8F5 khảm sẽ dùng điều trị là 20 ug/ml. Vào ngày thứ 3 và thứ 5 sau khi nuôi cấy, lấy 100 µl dịch nổi nuôi cấy và xác định lượng bài tiết IFN-gamma và perforin trong dịch nổi nuôi cấy này bằng cách sử dụng kit panen hạt từ tính tế bào T CD8+ của người (Millipore, Cat. #: HCD8MAG-15K). Sau 7 ngày ủ, phân lập các tế bào ung thư ruột kết-trực tràng LS174T và nhuộm màu bằng 7-AAD và xác định khả năng sống sót của tế bào bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy. Fig. 7a thể hiện kết quả bài tiết IFN-gamma và perforin bởi các tế bào T CD8+ được hoạt hoá, khi được điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm trong điều kiện đồng nuôi cấy tế bào LS174T và tế bào T CD8+ của người. Trong cùng điều kiện của Fig. 7a, Fig. 7b thể hiện gia tăng gây chết tế bào ung thư ruột kết-trực tràng LS174T khi điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm.

Như thể hiện trên đồ thị của Fig. 7a, bài tiết IFN-gamma và perforin gia tăng bởi các tế bào T CD8+ và gia tăng chết tế bào LS174T, khi điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm trong điều kiện đồng nuôi cấy tế bào LS174T và tế bào T CD8+ của người.

3.2. Phân tích hoạt tính tế bào T sau khi đồng nuôi cấy các tế bào T CD8+ và nhiều loại tế bào ung thư

Các tế bào T CD8+ được phân lập như trong Ví dụ 3.1, và hoạt tính tế bào T do kháng thể 8F5 khảm được khẳng định theo phương pháp ELISPOT trong điều kiện đồng nuôi cấy với nhiều loại tế bào ung thư. Phân tích IFN-gamma bằng kit Human IFN gamma ELISPOT Ready-SET-Go! (Ebioscience; Cat. #: 88-7386-21). Thêm một thể tích 100 µl/giếng có chứa $2,5 \times 10^4$ tế bào T CD8+ và 5×10^3 tế bào ung thư lần lượt vào mỗi giếng và ủ các tế bào trong 3 ngày, và sau đó phát hiện các vết tế bào biểu hiện IFN gamma theo phương pháp được mô tả trong kit này.

Fig. 8 cho thấy là bài tiết IFN-gamma được gia tăng chọn lọc chỉ khi điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm trong điều kiện đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ và nhiều loại tế bào ung thư như tế bào NCI –N87, SNU-719 hoặc PLC/PRF/5.

Như thể hiện trên Fig. 8, bài tiết IFN-gamma được gia tăng chọn lọc chỉ khi điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm trong điều kiện đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ và nhiều loại tế bào ung thư.

Ví dụ 4: Ức chế hoạt tính tế bào T bằng kháng nguyên CD66c

Để khẳng định là hoạt tính tế bào T bởi kháng thể 8F5 là do kháng nguyên CD66c, đây là kháng nguyên của kháng thể 8F5, khi đồng nuôi cấy tế bào T CD8+ của người và các tế bào ung thư, các tác giả sáng chế đã xét nghiệm xem liệu hoạt hoá PBMC của người có bị ức chế bởi kháng nguyên CD66c hay không.

Cụ thể là, nhuộm màu IFN-gamma nội bào (nhuộm màu trong bào tương) và thử nghiệm ELISPOT được sử dụng để đo tình trạng hoạt hoá tế bào T.

Kháng thể OKT3 được điều trị ở 1 ug/ml và kháng nguyên CD66c được sử dụng ở 10 ug/ml.

Để nhuộm màu IFN-gamma bên trong các tế bào T, pha loãng dung dịch Brefeldin A (1000X) (EBioscience, Cat. #: 00-4506-51) ở 1× và xử lý sơ bộ 3 giờ trước khi nhuộm màu, và nhuộm màu bằng Anti-Human IFN gamma PE (EBioscience, Cat. #: 12-7319-41) và FITC Mouse Anti-Human TCR- α / β (BD Biosciences; Cat. #: 347773), và phân tích bằng đếm tế bào dòng chảy.

Fig. 9a đến Fig. 9c cho thấy là kháng nguyên CD66c có thể ức chế hoạt tính tế bào T. Fig. 9a thể hiện kết quả đo nồng độ IFN-gamma nội bào như là một yếu tố cho hoạt tính tế bào T bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy, và Fig. 9c là kết quả đo bài tiết IFN-gamma bằng ELISPOT. Trên Fig. 9b và Fig. 9c, hoạt tính tế bào T bị ức chế tương tự, khi sử dụng kháng nguyên CD66c từ nguồn khác.

Như thể hiện trên Fig. 9a, các tế bào T dương tính với IFN-gamma giảm từ 15,55% xuống còn 8,87% khi đồng điều trị bằng kháng nguyên CD66c, do đó có ức chế hoạt tính tế bào T bởi kháng nguyên CD66.

Gia tăng hoặc ức chế sản sinh IFN-gamma ở PBMC của người còn được

kháng định bằng ELISPOT theo phương pháp của Ví dụ 3.2, và hai kháng nguyên CD66c mà do DINONA Inc. sản xuất nội bộ và mua bên ngoài (Sino Biological Inc., Cat. # 10823 -H08H-50) được sử dụng ở 10 ug/ml. Trong cả hai thử nghiệm, cả hai trường hợp được điều trị bằng các kháng nguyên CD66c cho thấy giảm đáng kể số lượng vết dương tính với IFN-gamma (Fig. 9b, Fig. 9c).

Ví dụ 5: Gây cảm ứng hoạt hoá tế bào T bằng kháng thể 8F5 khảm

5.1. Hoạt hoá tế bào T được gia tăng

Để xác định tác động của kháng thể 8F5 khảm lên hoạt hoá tế bào T bằng kháng thể OKT3, 2×10^6 PBMC của người được cho vào đĩa 35-mm trong điều kiện kháng thể OKT3 được cố định ở nồng độ 0,3 mg /ml và nuôi cấy trong 3 ngày. Vào thời điểm này, kháng thể 8F5 khảm được điều trị ở nồng độ 20 ug/ml. Sau 3 ngày, các tế bào T CD4+ và các tế bào T CD8+ được nhuộm màu bằng Anti-Human CD69 PE (Ebioscience, Cat. #: 12-0699-41), Anti-Human CD107a (LAMP-1) PE (Ebioscience, Cat. #: 12-1079-41) và Anti-Human CD25 APC (Ebioscience, Cat. #: 17-0259-41). Anti-CD4-APC và Anti-CD8-FITC được nhuộm màu bằng thuốc thử do DINONA INC (Hàn Quốc) sản xuất, và lần lượt nhóm dương tính với CD4 và CD8 bị chặn trên thiết bị đếm tế bào dòng chảy. Fig.10a và Fig. 10b là kết quả cho thấy kháng thể 8F5 khảm gia tăng hoạt hoá tế bào T và gia tăng nhiều loại protein đánh dấu bề mặt tế bào được hoạt hoá như CD69, CD107, CD25 và chất tương tự, trong điều kiện hoạt hoá tế bào T bằng kháng thể OKT3 được gắn với.

Như thể hiện trên Fig. 10a, khi kháng thể 8F5 khảm được sử dụng cho cả các tế bào dương tính với CD4 và CD8, có gia tăng tỷ lệ dương tính của chất đánh dấu CD69 của hoạt hoá tế bào T. Như thể hiện trên Fig. 10b, tỷ lệ dương tính chất đánh dấu CD107 và CD 25 của hoạt hoá tế bào T gia tăng ở các tế bào dương tính với CD8. Kết quả hoạt hoá tế bào T gia tăng gây ra bởi kháng thể 8F5 khảm trong các điều kiện hoạt hoá tế bào T này cho thấy là kết quả của Ví dụ 3 được phản ánh như là kết quả hoạt hoá của bản thân tế bào T. Như mô tả trong Ví dụ 4, có thể phục hồi ức chế hoạt tính tế bào T gây ra bởi kháng nguyên CD66c bằng kháng thể kháng CD66c, do đó duy trì hoặc tăng cường hoạt tính tế bào T là gây chết tế bào ung thư.

5.2. Hoạt hoá tế bào T được gia tăng trong MLR

Thực hiện các thử nghiệm MLR (Phản ứng lympho bào hỗn hợp) để khẳng định hơn nữa hoạt hoá tế bào T do điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm. Trước tiên, PBMC của người được phân lập và chỉ PBMC đã gần được điều trị bằng IL-4 (5×10^3 đơn vị/ml, JWCReagene) và GM-CSF (5×10^3 đơn vị/ml, JWCReagene) ở hai thời điểm cách nhau 3 ngày để phân biệt với các tế bào phân nhánh. Sau đó, DC được trộn với PBMC của người khác với tỷ lệ phối trộn PBMC: DC là 5:1, và được nuôi cấy trong 5 ngày. Số lượng các tế bào PBMC là $1,4 \times 10^6$ tế bào/giếng trong trường hợp đĩa 12 giếng. Sau 5 ngày, phân tách các tế bào và nhuộm màu bằng CD4-FITC/CD107-PE/CD25-APC hoặc CD8-FITC/CD107-PE/CD25-APC và phân tích bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy. Fig. 11a và Fig. 11b cho thấy là kháng thể 8F5 khảm hoạt hoá các tế bào dương tính với CD4 và CD8 trong điều kiện MLR (Phản ứng lympho bào hỗn hợp), trong đó các tế bào phân nhánh và PBMC thu được từ nguồn khác nhau được phối trộn.

Như thể hiện trên Fig. 11a và Fig. 11b, tỷ lệ dương tính của CD107 và CD 25 ở các tế bào dương tính với CD4 và CD8 là gia tăng đáng kể do sử dụng kháng thể 8F5 khảm thậm chí trong điều kiện MLR.

Do đó, chứng tỏ là kháng thể 8F5 khảm có thể gia tăng hoạt hoá tế bào T, trong cả hai trường hợp hoạt hoá tế bào T bởi OKT3 và hoạt hoá tế bào T bởi các tế bào miễn dịch dị sinh, do đó kháng thể 8F5 khảm làm cho các tế bào T tiêu diệt tế bào ung thư.

Ví dụ 6: Hoạt hoá PBMC ở bệnh nhân ung thư dạ dày bằng kháng thể 8F5 khảm

Để đánh giá hoạt hoá PBMC bằng kháng thể 8F5 khảm khi đồng nuôi cấy PBMC với tế bào ung thư dạ dày, các tế bào ung thư được phân lập từ dịch cổ trướng của bệnh nhân thực tế bị bệnh ung thư dạ dày, mà không phải là các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm, và hoạt hoá tế bào miễn dịch được thử nghiệm, khi sử dụng kháng thể 8F5 khảm. Mẫu dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư dạ dày lấy từ Asan Medical Center, Seoul, Hàn Quốc, và phân tách các PBMC từ máu của cùng bệnh nhân có các tế bào ung thư dạ dày lấy mẫu, trong đó khẳng định có dương tính CD66c từ các mẫu dịch cổ trướng, và tiếp đó thử nghiệm bằng ELISPOT theo phương pháp trong Ví dụ 3.2.

Fig. 12a thể hiện kết quả phân tích ELISPOT trong đó có gia tăng bài tiết IFN-gamma, khi được điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm trong điều kiện đồng nuôi cấy các tế bào ung thư dạ dày của người được phân lập từ dịch cổ trướng của bệnh nhân ung thư dạ dày được đồng nuôi cấy với PBMC của người. Fig. 12b và Fig. 12c cho thấy kết quả tương tự khi tiến hành thử nghiệm ELISPOT bổ sung trên bệnh nhân ung thư dạ dày dương tính với kháng nguyên CD66c.

Khi sử dụng kháng thể 8F5 khảm, có gia tăng vết dương tính với IFN-gamma tương tự đến mức như khi sử dụng kháng thể OKT làm đối chứng dương tính cho kháng thể hoạt hoá tế bào T (Fig. 12a). Kết quả này chỉ ra là điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm gây cảm ứng hoạt hoá các tế bào tự miễn dịch.

Các tế bào ung thư dạ dày dương tính với CD66c được phân lập bổ sung từ dịch cổ trướng của các bệnh nhân ung thư dạ dày khác nhau, được phối trộn với PBMC được phân lập từ máu của người bình thường, và cho thử nghiệm ELISPOT theo cách tương tự như trong Ví dụ 3.2. Như thể hiện trên Fig. 12b, có gia tăng dương tính IFN-gamma khi điều trị bằng kháng thể 8F5 khảm mặc dù ở mức độ hơi khác.

Ví dụ 7: Gia tăng mức biểu hiện PD-L1 bởi kháng thể 8F5 khảm

Các tế bào ung thư và PBMC được đồng nuôi cấy để đánh giá gia tăng biểu hiện PD-L1 bởi 8F5 khảm.

Để phân tích sự thay đổi protein liên quan đến điểm kiểm soát miễn dịch bởi kháng thể 8F5 khảm khi đồng nuôi cấy PBMC với LS-174-T (dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng), NCI-N87 (dòng tế bào ung thư dạ dày) hoặc A549 (dòng tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), nhận thấy có PD-L1 trên bề mặt tế bào. Lần lượt tế bào ung thư và PBMC được trộn với tỷ lệ 1: 3 ($0,5 \times 10^6$ tế bào: $1,5 \times 10^6$ tế bào/giếng) trong đĩa 6 giếng và ủ trong 24 giờ kèm điều trị bằng 20 μg / ml kháng thể. PD-L1 trên bề mặt tế bào ung thư và các tế bào PBMC được nhuộm màu bằng anti-Human CD274 (PD-L1, B7-H1) và PE (Ebioscience, Cat. #: 12-5983-41), và nhuộm đồng thời bằng CD45-FITC (DINONA INC) để phân biệt các tế bào ung thư với các tế bào PBMC.

Fig. 13a mô tả kết quả kháng nguyên PD-L1 gia tăng trên bề mặt tế bào của PBMC và tế bào ung thư A549, khi đồng nuôi cấy PBMC của người và các tế bào

ung thư phổi không phải tế bào nhỏ A549. Fig. 13b mô tả sự biểu hiện gia tăng của kháng nguyên PD-L1 trên bề mặt của các dòng tế bào A549, NCI-N87 và LS-174-T.

Như thể hiện trên Fig. 13a và Fig. 13b, nồng độ bề mặt tế bào của PD-L1 gia tăng ở cả các tế bào ung thư và PBMC khi sử dụng kháng thể 8F5 khảm. Điều này gián tiếp chứng tỏ là có hoạt hoá các tế bào miễn dịch bởi kháng thể 8F5 khảm, chỉ ra là có thể đồng thời điều trị bằng các chất ức chế PD-1/PD-L1 trong tương lai.

Ví dụ 8: Hoạt hoá PBMC bởi kháng thể 8F5 được làm giống người

Hoạt hoá PBMC bởi kháng thể 8F5 được làm giống người khi đồng nuôi cấy các tế bào ung thư và các PBMC được thử nghiệm. Đó là, năm loại kháng thể 8F5 được làm giống người được xác định như thể hiện trong Bảng 11 được lựa chọn và tiến hành thử nghiệm ELISPOT như trong Ví dụ 3.2. Dòng tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ A549 (dòng tế bào ung thư phổi biểu mô tuyến) được sử dụng cho các tế bào ung thư được đồng nuôi cấy, và nồng độ của kháng thể được sử dụng là 20 ug/ml. Ba ngày sau, nhận diện các vết dương tính với IFN-gamma và nhận thấy là tất cả năm kháng thể 8F5 được làm giống người được thử nghiệm như trên Fig. 14 gây gia tăng các vết dương tính với IFN-gamma đến cùng mức như kháng thể 8F5 khảm. Do đó, khẳng định được là các kháng thể 8F5 được làm giống người có chức năng tương tự như các kháng thể 8F5 khảm.

Fig. 14a và Fig. 14b cho thấy là kháng thể được làm giống người tái tổ hợp có mức chức năng kháng thể tương tự do gia tăng bài tiết IFN-gamma khi đồng nuôi cấy PBMC của người với các tế bào ung thư A549 theo kiểu tương tự như kháng thể 8F5 khảm.

Ví dụ 9: Gây chết tế bào ung thư bằng kháng thể 8F5 được làm giống người

9-1: Đồng nuôi cấy các tế bào ung thư và các tế bào T CD3+

Chết tế bào theo chương trình của các tế bào ung thư bởi kháng thể 8F5 được làm giống người khi đồng nuôi cấy các tế bào ung thư và các tế bào T CD3+ được đánh giá. Đã khẳng định in vitro là các tế bào ung thư bị tiêu diệt bởi các tế bào T được hoạt hoá khi các tế bào này được đồng nuôi cấy với các tế bào LS-174-T, dòng tế bào ung ruột kết, và các tế bào dương tính với CD3 của người.

Cụ thể là, các tế bào ung thư và các tế bào T (hoặc PBMC) được đồng nuôi

cấy trong một thể tích 100 μl /giếng ở tỷ lệ 1×10^4 tế bào: 1×10^5 tế bào trong đĩa 96-giếng và được điều trị bằng 10 μg /ml kháng thể. Sau 3 ngày, đo mức độ chết tế bào ung thư bằng bộ Ez-Cytox (Daeil Biotech, EZ-1000). Các kháng thể đã sử dụng tương ứng là kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019 (Bảng 11, E3), PD-1 (kháng thể cùng trình tự pembrolizumab), PD-L1 (kháng thể cùng trình tự atezolizumab), CEACAM6 (kháng thể có cùng trình tự với kháng thể kháng-CEACAM6 của Bayer). Fig. 15a là kết quả của thử nghiệm gây chết tế bào, và kháng thể 8F5 được làm giống người theo sáng chế thể hiện tác dụng gây chết tế bào cao nhất.

9-2: Đồng nuôi cấy các tế bào ung thư và PBMC

Chết tế bào theo chương trình của các tế bào ung thư bởi kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019) khi đồng nuôi cấy các tế bào ung thư và các PBMC được đánh giá.

Cụ thể là, tiến hành đánh giá về cơ bản theo cách tương tự như trong Ví dụ 9-1, ngoại trừ thay vì các điều kiện để đồng nuôi cấy các tế bào LS-174-T của dòng tế bào ung thư ruột kết, và các tế bào T dương tính với CD3, dòng tế bào A549 (dòng tế bào ung thư phổi biểu mô tuyến) và hai PBMC khác nhau (Người cho 1, Người cho 2) được sử dụng. Như thể hiện trên Fig. 15b, các tế bào ung thư trong các giếng được điều trị bằng kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019; E3, IgG1) thể hiện tác dụng gây chết tế bào ung thư cao nhất ở cả hai loại PBMC (Fig. 15b).

Ví dụ 10: Đánh giá hiệu lực chống ung thư bằng cách sử dụng mô hình động vật trên chuột nhắt

10-1: Đánh giá hiệu lực chống ung thư của kháng thể 8F5 khám bằng cách sử dụng mô hình chuột nhắt NOD / SCID

Để khẳng định tác dụng chống ung thư in vivo của kháng thể 8F5 khám, chuột suy giảm miễn dịch NOD / chuột SCID được sử dụng. Trong các patent (US 10-1214177; US: 8404812), tác dụng chống ung thư được đánh giá bằng cách sử dụng chuột trụi lông. Tuy nhiên, trong thử nghiệm trên động vật sử dụng chuột trụi lông, các tế bào miễn dịch thể hiện tác dụng chống ung thư là tế bào miễn dịch của chuột làm tế bào hiệu ứng, không phải là tế bào miễn dịch của người. Do đó, có hạn chế để

chứng minh một kháng thể ứng cử có thể hiện hiệu lực trị liệu ở người trên thực tế hay không. Do đó, để đánh giá tác dụng chống ung thư của kháng thể gây chết tế bào ung thư trong thử nghiệm trên động vật bởi các tế bào miễn dịch về cơ bản của người, chuột NOD / SCID không có các tế bào miễn dịch bao gồm các tế bào T của chuột được sử dụng cho thử nghiệm trên động vật này.

Kháng thể Asialo GM1 được cho dùng để làm suy kiệt các tế bào giết tự nhiên của chuột (NK) một ngày trước khi cho dùng các tế bào ung thư và PBMC của người. Ngày tiếp theo, tiêm các tế bào ung thư và PBMC cho chuột. Tiêm dưới da các tế bào ung thư ruột kết LS-174-T ở nồng độ 5×10^6 tế bào/chuột, và tiêm trong màng bụng PBMC ở liều 1×10^7 tế bào. Bốn ngày sau khi tiêm các tế bào, tiêm tĩnh mạch kháng thể ở liều dùng 10 mg/kg, và sau đó nhận thấy có khối u do tiêm dưới da các tế bào ung thư và đo kích thước khối u này.

Fig. 16a sử dụng các tế bào LS-174-T làm tế bào ung thư ruột kết và Fig. 16b sử dụng các tế bào A549 làm các tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ cho mô hình cấy ghép ở chuột NOD-SCID và kháng thể 8F5 khám.

Fig. 16a thể hiện kết quả in vivo hiệu lực chống ung thư bằng cách sử dụng mô hình trên chuột trong điều kiện làm giống người, trong đó PBMC của người được tiêm với kháng thể 8F5 khám. Nhóm được điều trị bằng-kháng thể 8F5 khám thể hiện mức ức chế tăng trưởng khối u cao nhất (TGI) mà không có sự khác biệt cá thể người cho PBMC.

Trong thử nghiệm thứ nhất, tác dụng chống ung thư là 40%. Thử nghiệm thứ hai cho thấy tác dụng chống ung thư là 46%. Fig. 16a cho thấy mô hình cấy ghép với các tế bào ung thư ruột kết LS-174-T, và Fig. 16b cho thấy mô hình cấy ghép với các tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, các tế bào A549. Trong cả hai trường hợp, nhóm được điều trị bằng kháng thể 8F5 khám thể hiện tác dụng chống ung thư mạnh nhất. Nhóm được cho dùng kháng thể PD-1 (kháng thể có cùng trình tự như Nivolumab) có rất ít hoặc không có tác dụng chống ung thư, chỉ ra là biểu hiện kháng nguyên PD-L1 trên bề mặt tế bào ung thư là rất yếu và do đó không thể đáp ứng.

Do đó, đã khẳng định là kháng thể khám 8F5 có thể gây cảm ứng các tác dụng chống ung thư in vivo trên mô hình động vật ung thư ruột kết-trực tràng và ung thư phổi được ghép tế bào miễn dịch của người.

10-2: Đánh giá hiệu lực chống ung thư của kháng thể 8F5 được làm giống người bằng cách sử dụng mô hình LS-174-T trên chuột nhắt NOD/SCID

Hiệu lực chống ung thư được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình động vật theo cách về cơ bản tương tự như trong Ví dụ 10-1, ngoại trừ mô hình cấy ghép chuột nhắt NOD-SCID bằng cách sử dụng các tế bào LS-174-T làm tế bào ung thư ruột kết và kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019, Bảng 11) được sử dụng. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 16c.

Cùng kiểu tác dụng chống ung thư được khẳng định trong điều kiện thử nghiệm, trong đó kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019) được dùng cho chuột NOD-SCID trong mô hình cấy ghép dòng tế bào LS-174-T của tế bào ung thư ruột kết (Fig. 16c.)

10-3: Đánh giá hiệu lực chống ung thư của kháng thể 8F5 được làm giống người bằng cách sử dụng mô hình LS-174-T trên chuột nhắt NSG

Tiến hành thử nghiệm trên động vật bằng cách sử dụng chuột nhắt NSG bị suy giảm miễn dịch nặng hơn chuột NOD/SCID được sử dụng trong các Ví dụ 10-1 và 10-2. Chuột NSG là chuột, trong đó hoạt tính của các tế bào NK vẫn là của chuột NOD/SCID bị loại bỏ hoàn toàn bằng cách gây cảm ứng đột biến ở gen thụ thể IL2 gamma (IL2R γ) ở chuột NOD/SCID, để loại bỏ hoàn toàn tác dụng của tế bào miễn dịch của chuột vẫn còn lại ít và để đánh giá tác dụng chỉ của các tế bào miễn dịch thu được từ người.

Mô hình cấy ghép chuột NSG sử dụng tế bào ung thư ruột kết LS-174-T, kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019, Bảng 11), kháng thể CEACAM6 của Bayer và kháng thể CEACAM1 của Merck được sử dụng. Fig. 16d và Fig. 16g thể hiện hiệu lực chống ung thư của kháng thể 8F5 được làm giống người bằng cách sử dụng các PBMC của người khác nhau làm tế bào hiệu ứng ở chuột suy giảm miễn dịch NSG.

Các kháng thể được sử dụng cho mô hình LS-174-T trên chuột NSG là kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019), kháng thể CEACAM6 của Bayer, và kháng thể CEACAM1 của Merck và tác dụng chống ung thư của các kháng thể này được so sánh. Khi so sánh với các kháng thể khác có các đích tương tự như kháng

thể 8F5 được làm giống người, kháng thể 8F5 được làm giống người thể hiện tác dụng chống ung thư tốt nhất.

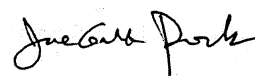
Fig. 16d thể hiện giá trị trung bình của các kết quả thử nghiệm, trong đó năm PBMC của người khác nhau được sử dụng làm tế bào hiệu ứng. Nhóm được cho dùng kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019) thể hiện tác dụng ức chế mạnh nhất đối với tăng trưởng khối u so với nhóm so sánh. Fig. 16e đến Fig. 16g là các đồ thị thể hiện tác dụng chống ung thư của từng kháng thể của từng người, khi được tiêm PBMC thu được từ ba người khác nhau (3 người) trong thử nghiệm này. Nhóm được cho dùng kháng thể 8F5 được làm giống người (protein ID: 3019; P E3) thể hiện tác dụng chống ung thư mạnh nhất được khẳng định ở ba nhóm được điều trị bằng PBMC khác nhau và các kết quả tương tự được khẳng định trong hai điều kiện thử nghiệm còn lại.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1

To: DINONA INC
253-6 Donggodo-Ri, Gemma-myun, Iksan-Si, Jeonbuk, South of KOREA

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : 8F5	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00230
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☐ A scientific description ☐ A proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on February 22, 2010	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Signature(s) :  Date : 2010. 2. 26.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD66c (cụm biệt hoá 66c) hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm các vùng xác định tính hỗ trợ (CDR) dưới đây:

CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 9,

CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 10,

CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 12,

CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và

CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 13,

với điều kiện là không bao gồm kháng thể chứa các CDR gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, và SEQ ID NO: 6.

2. Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể này bao gồm ít nhất một phân tử được chọn từ nhóm gồm trình tự khung (V-FR1) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 hoặc SEQ ID NO: 27, trình tự khung (V-FR2) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 hoặc SEQ ID NO: 37, trình tự khung (V-FR3) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 hoặc SEQ ID NO: 47, và trình tự khung (V-FR4) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 hoặc SEQ ID NO: 57.

3. Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này bao gồm ít nhất một phân tử được chọn từ nhóm gồm trình tự khung (L-FR1) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31, trình tự khung (L-FR2) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 hoặc SEQ ID NO: 41, trình

tự khung (L-FR3) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, hoặc SEQ ID NO: 51, và trình tự khung (L-FR4) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 hoặc SEQ ID NO: 61.

4. Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 18, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, hoặc SEQ ID NO: 21.

5. Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó mức biến thiên độ huỳnh quang của kháng thể này so với thuốc thử ANS là $< 200\%$ ở 62°C .

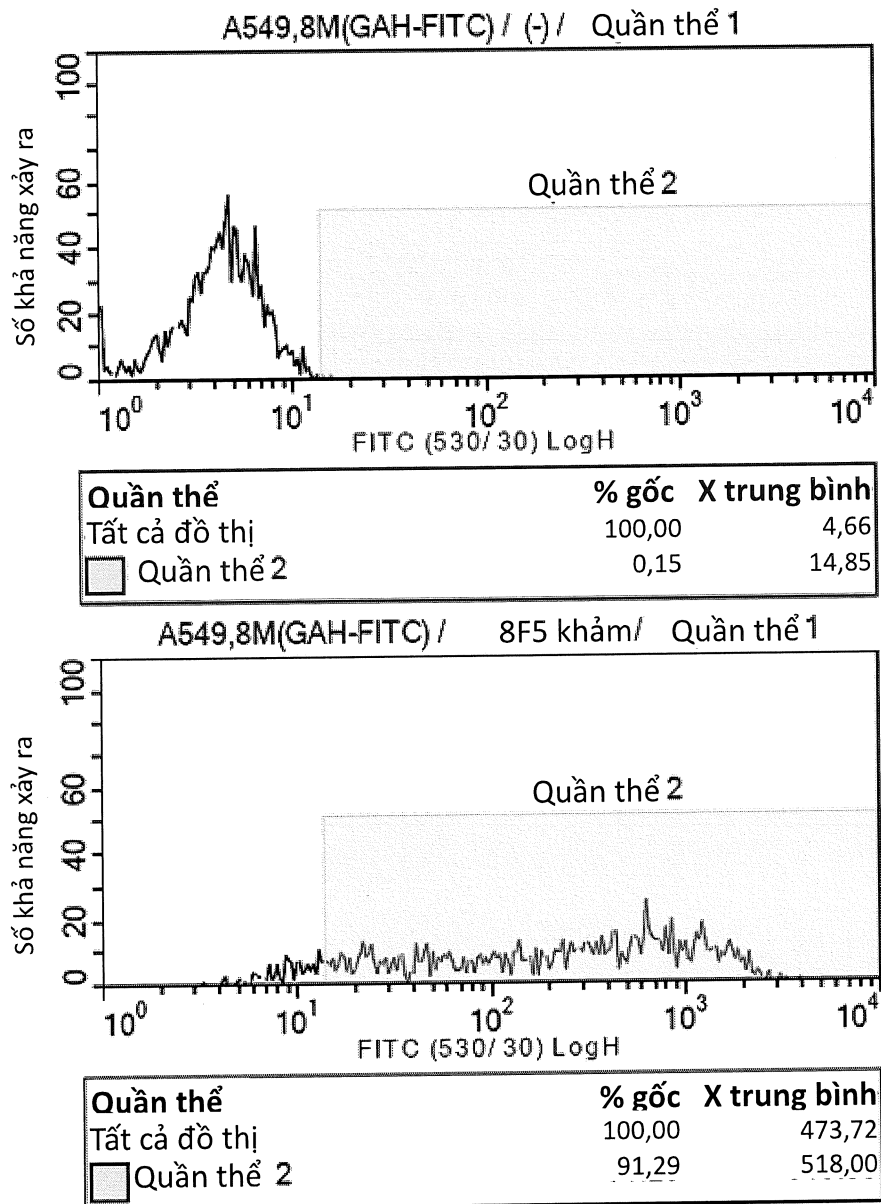
6. Kháng thể kháng CD66c hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên là scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' hoặc F(ab')₂ của kháng thể kháng CD66c.

7. Phân tử axit nucleic mã hoá trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18; mã hoá trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, và SEQ ID NO: 21; hoặc mã hoá cả trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng đã nêu và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ đã nêu.

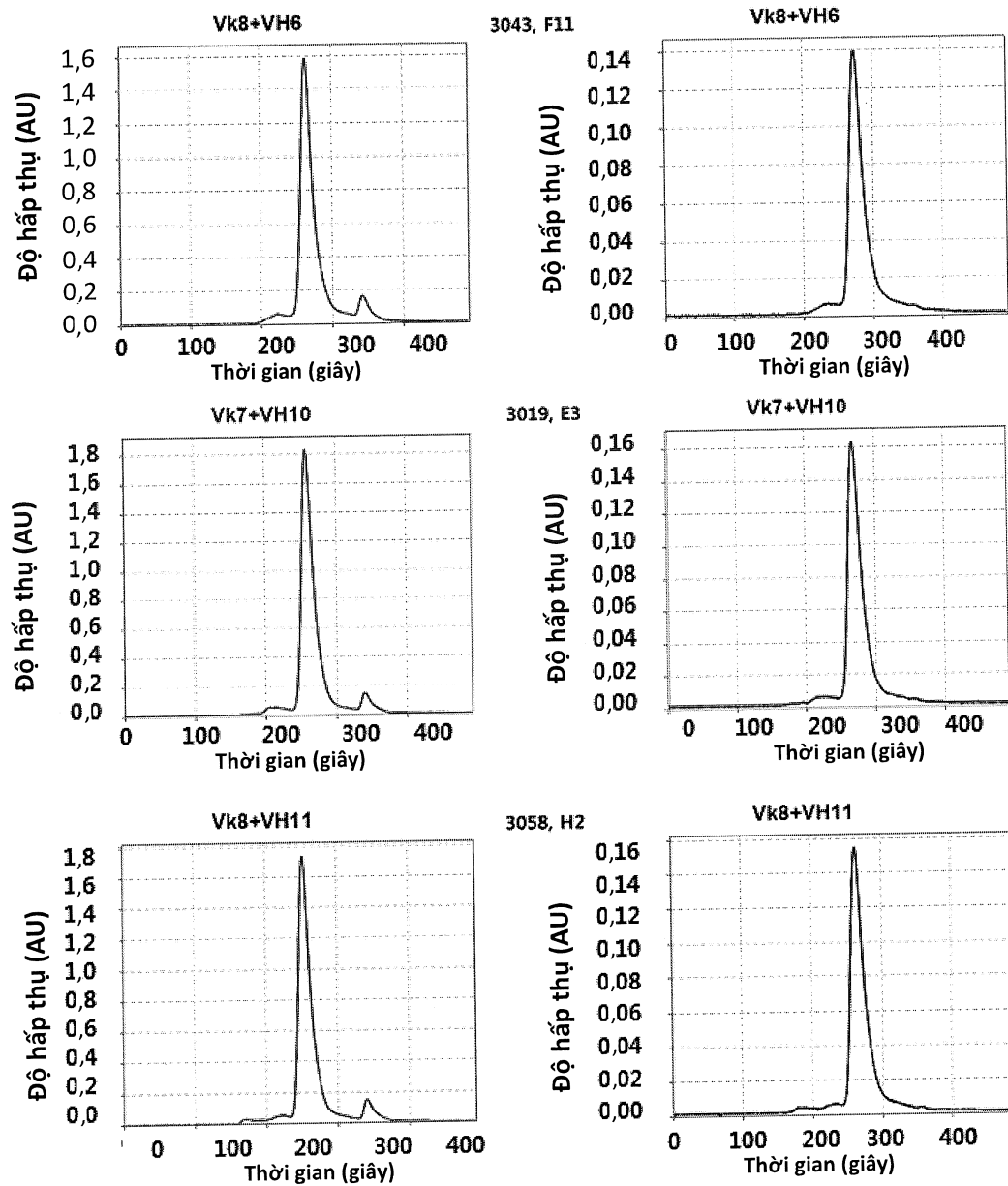
8. Vector tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 7.

9. Tế bào tái tổ hợp bao gồm vector tái tổ hợp theo điểm 8.

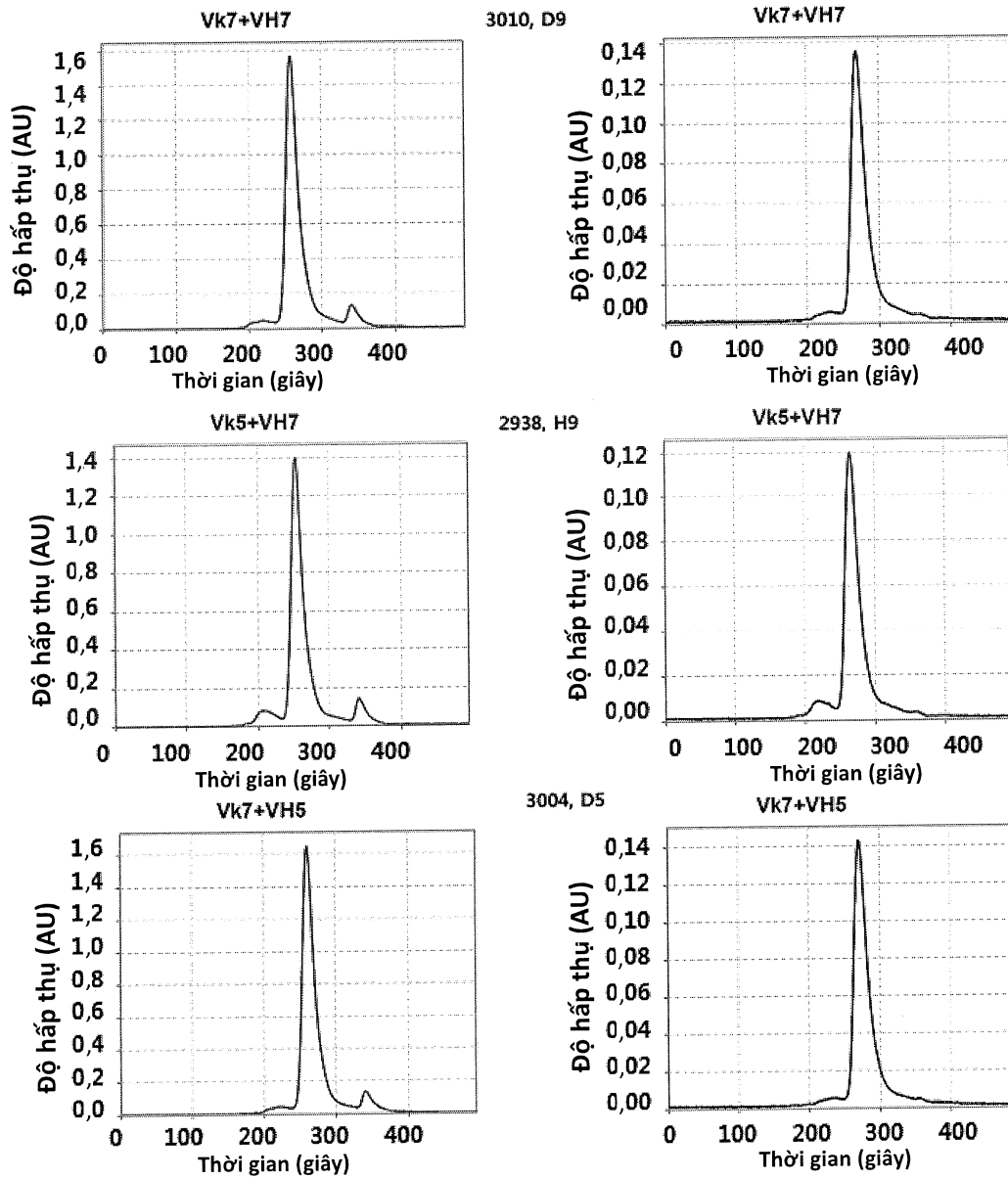
【Fig. 1】



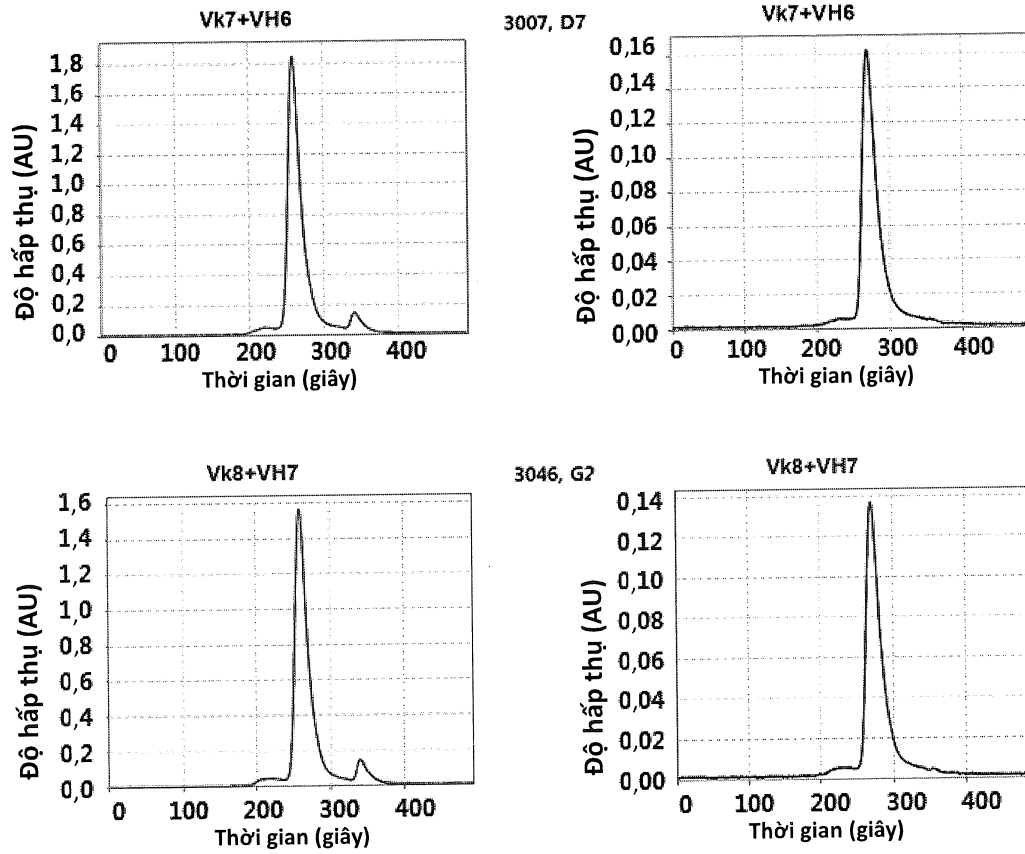
【Fig. 2a】



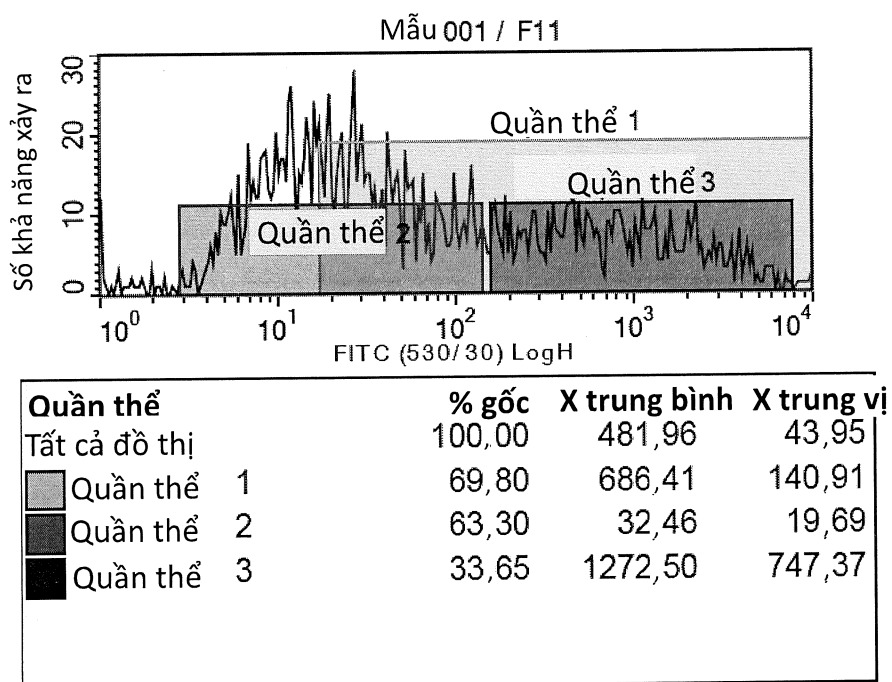
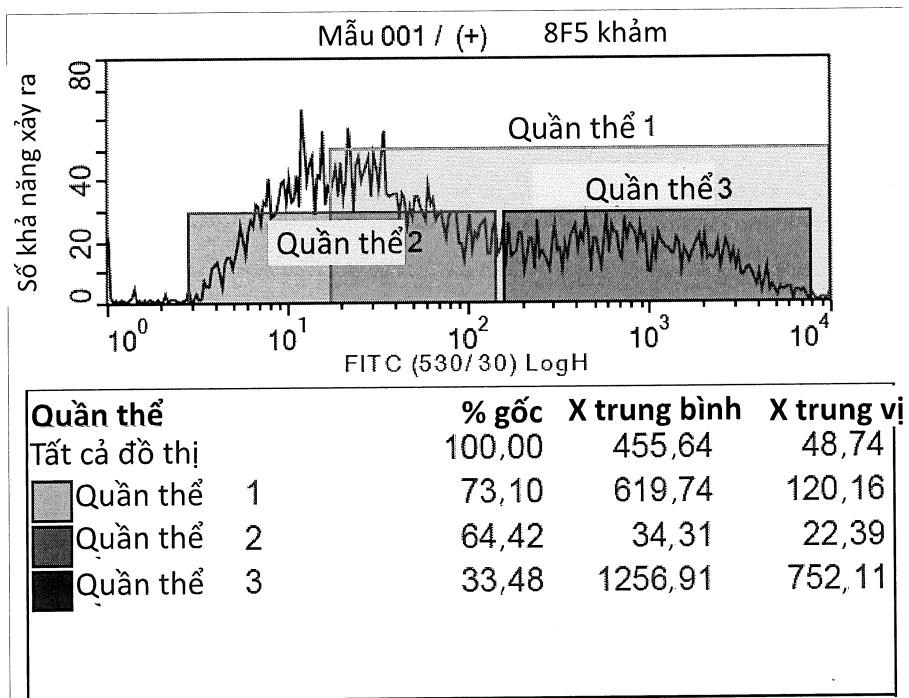
【Fig. 2b】



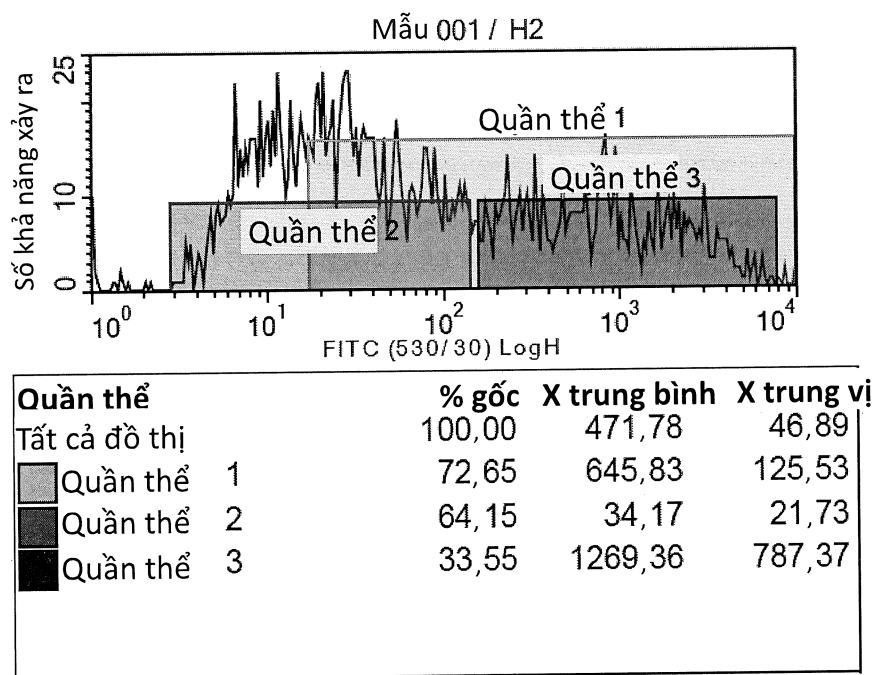
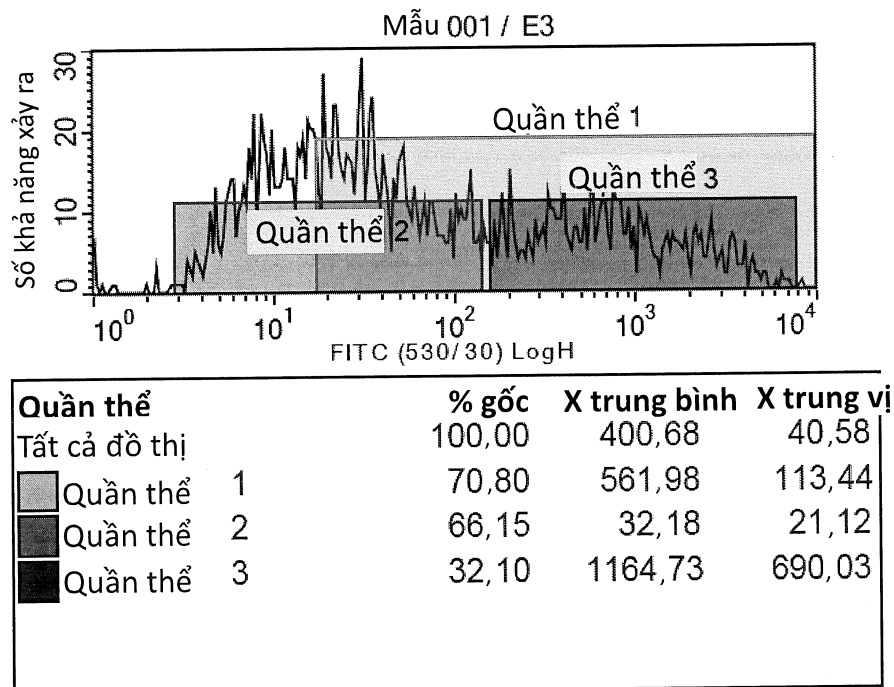
【Fig. 2c】



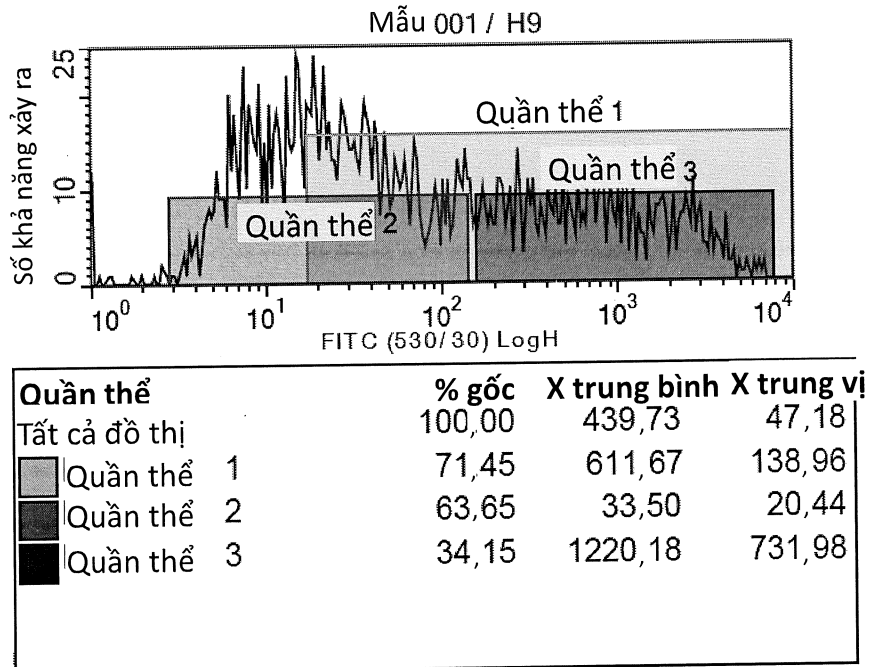
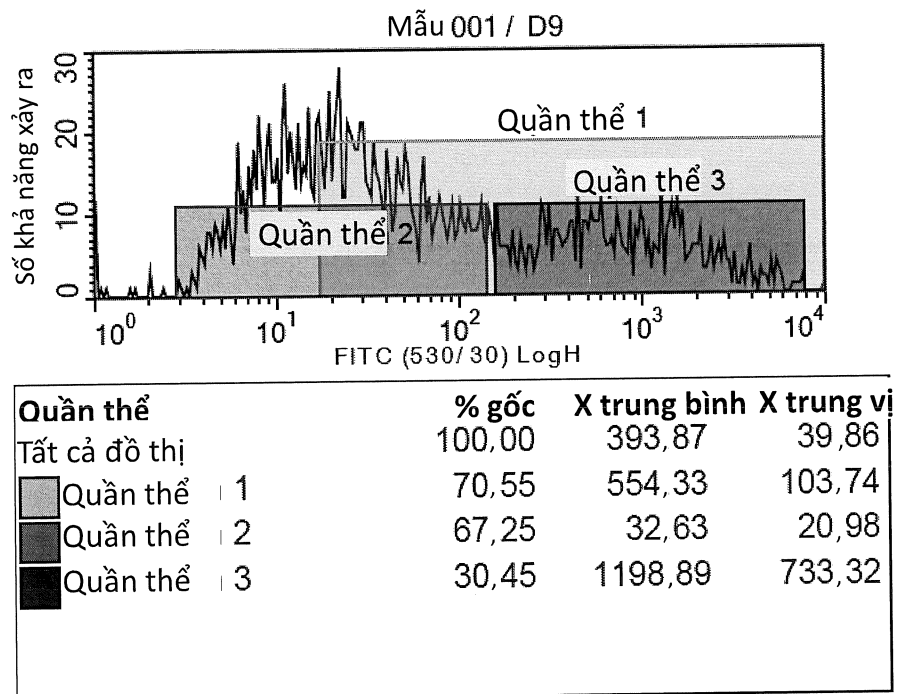
【Fig. 3a】



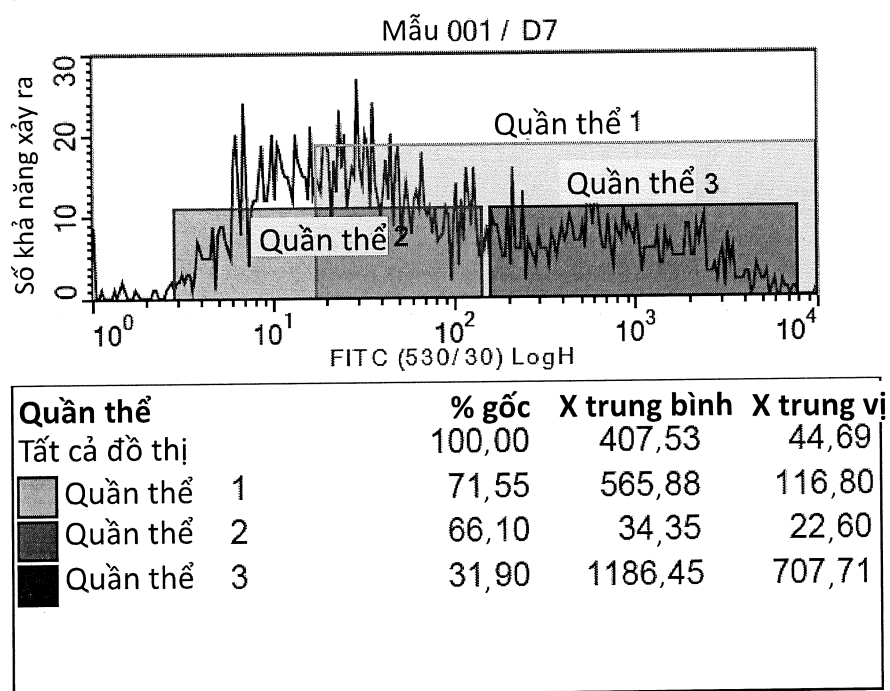
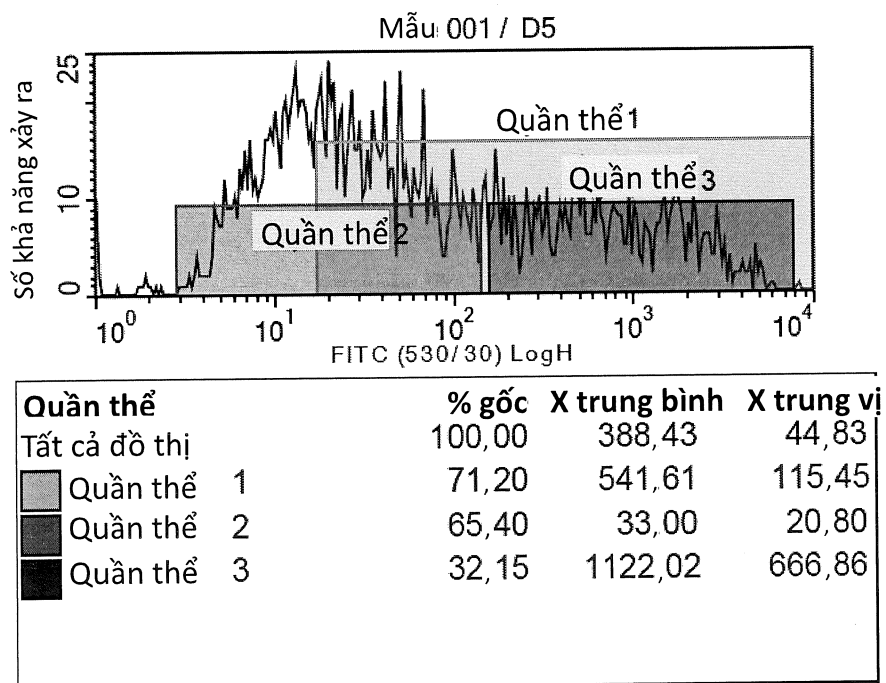
【Fig. 3b】



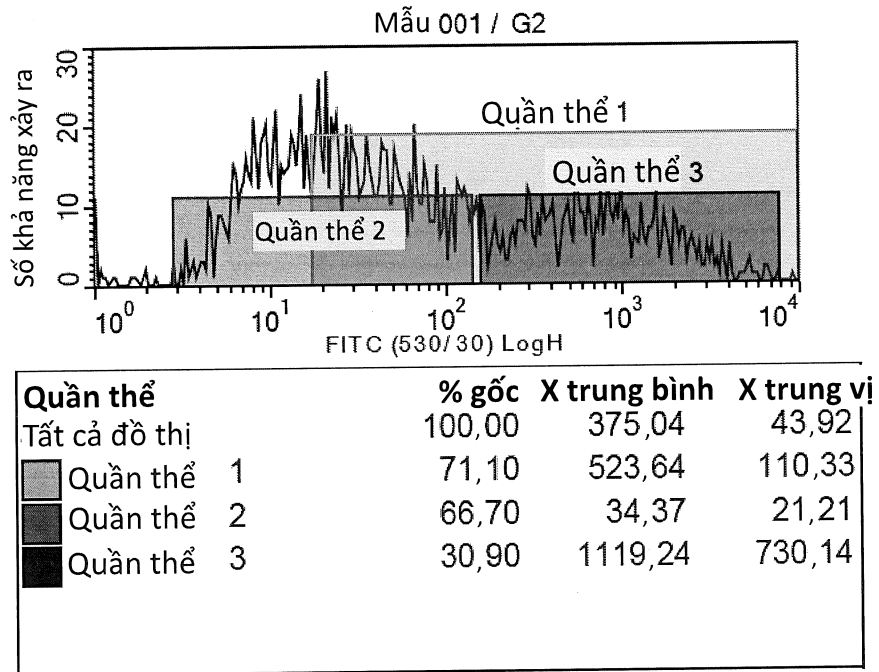
【Fig. 3c】



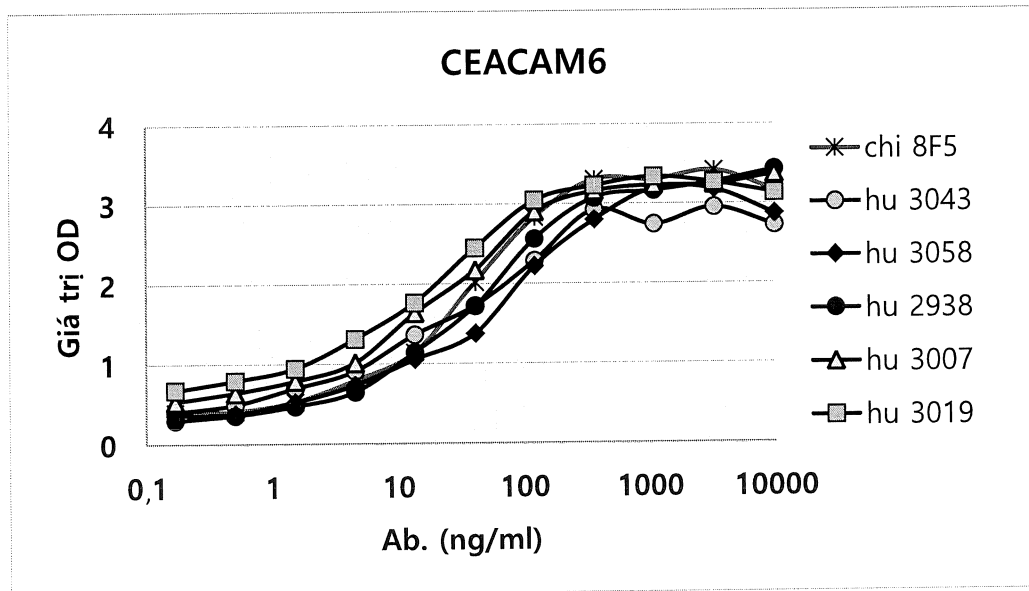
【Fig. 3d】



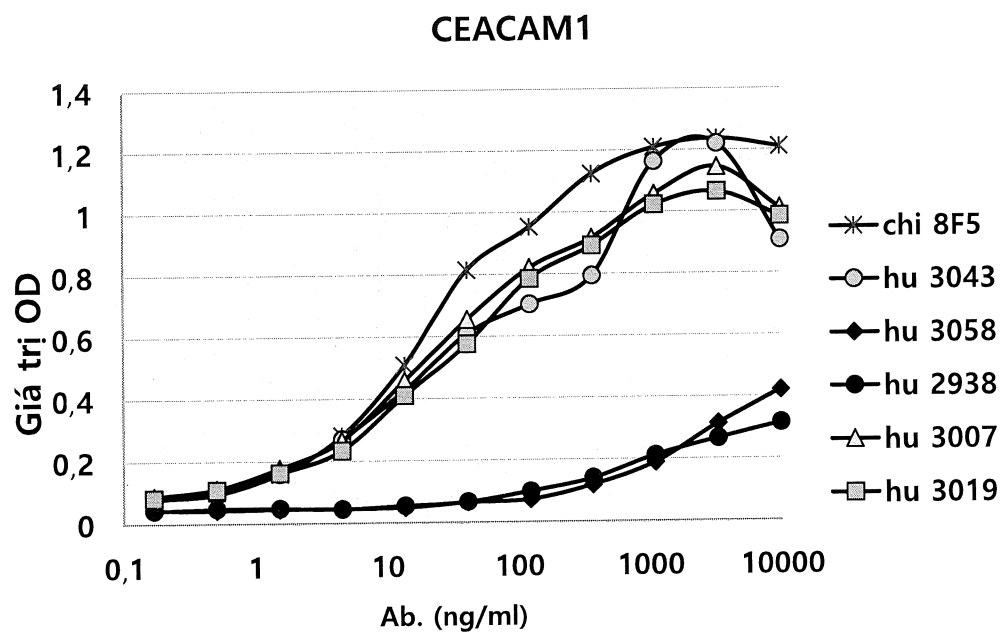
【Fig. 3e】



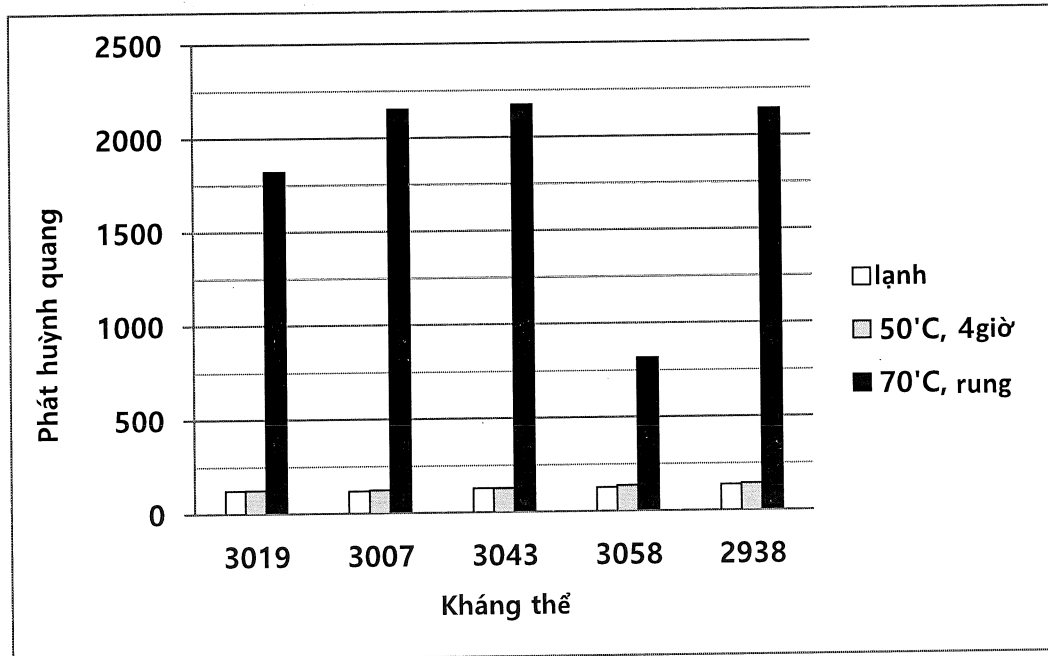
【Fig. 4a】



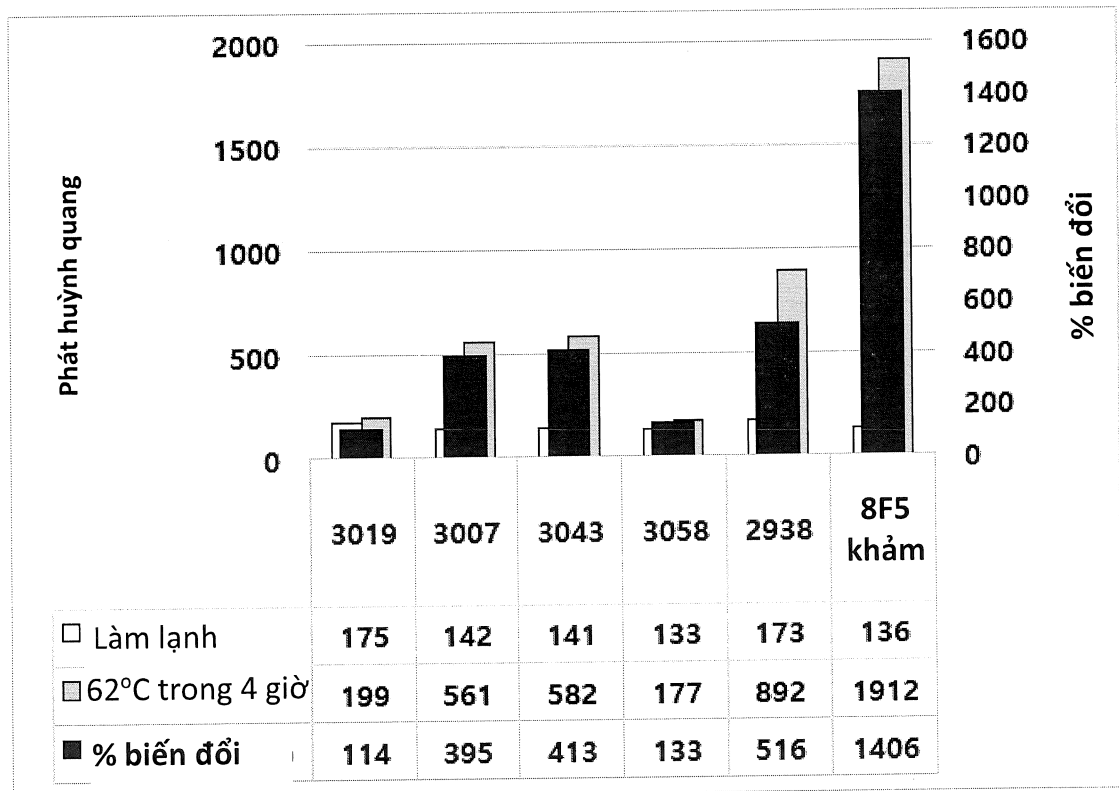
【Fig. 4b】



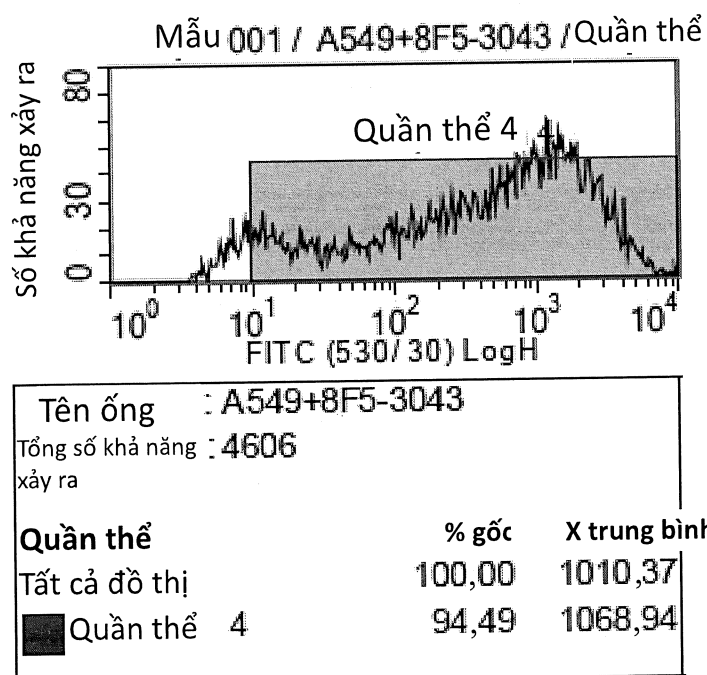
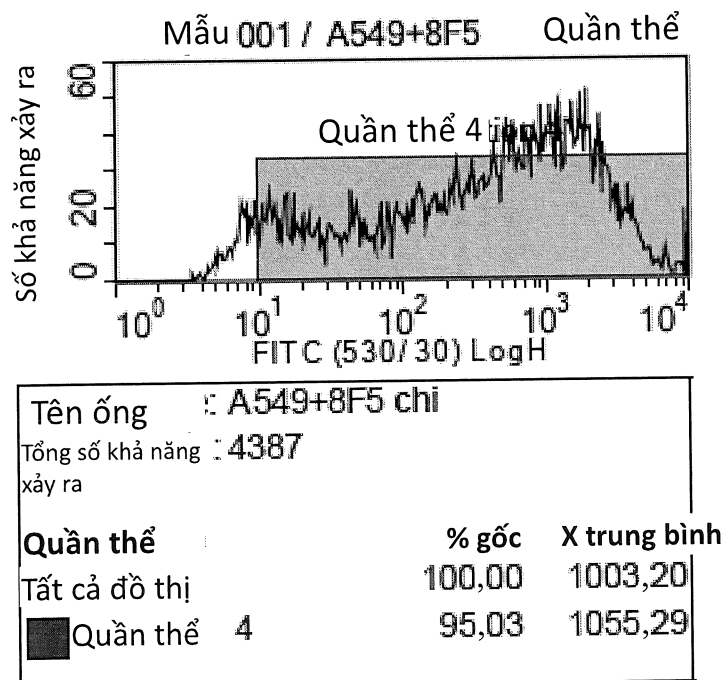
【Fig. 5a】



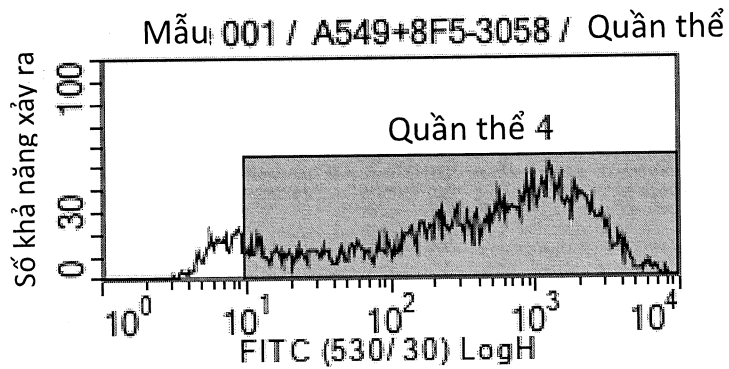
【Fig. 5b】



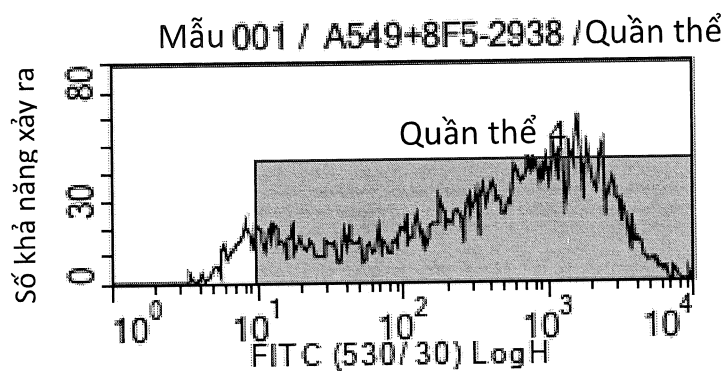
【Fig. 6a】



【Fig. 6b】

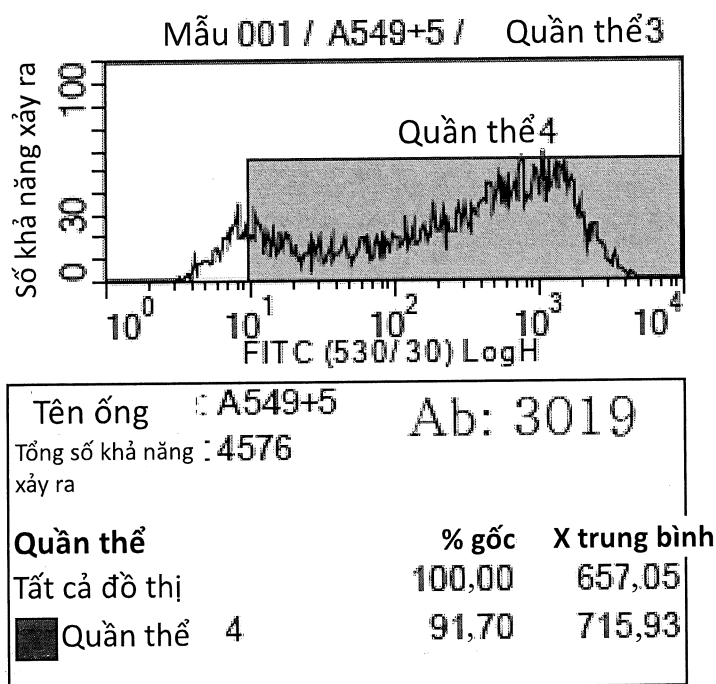
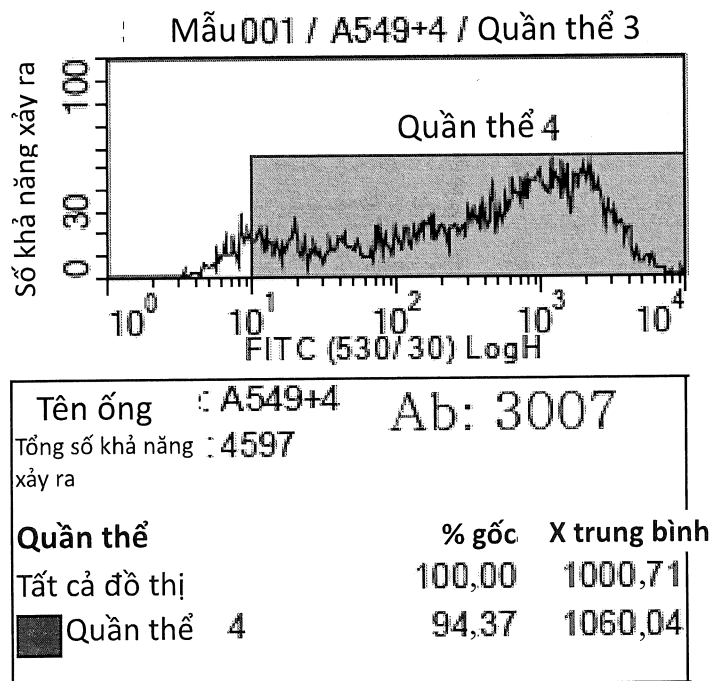


Tên ống : A549+8F5-3058		
Tổng số khả năng xảy ra : 4108		
Quần thể	% gốc	X trung bình
Tất cả đồ thị	100,00	936,15
Quần thể 4	91,38	1023,80

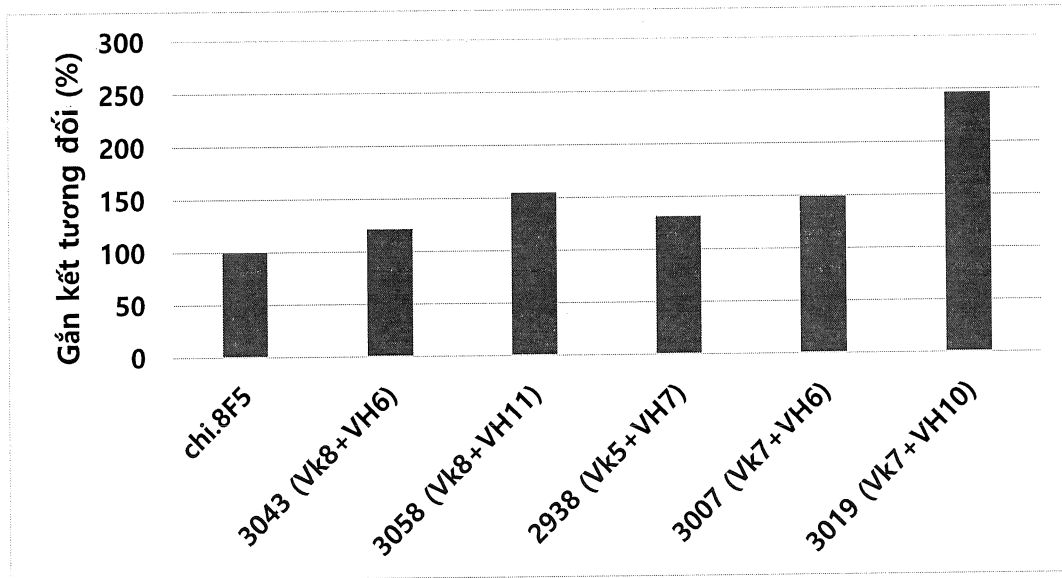


Tên ống : A549+8F5-2938		
Tổng số khả năng xảy ra : 4610		
Quần thể	% gốc	X trung bình
Tất cả đồ thị	100,00	969,18
Quần thể 4	94,40	1026,23

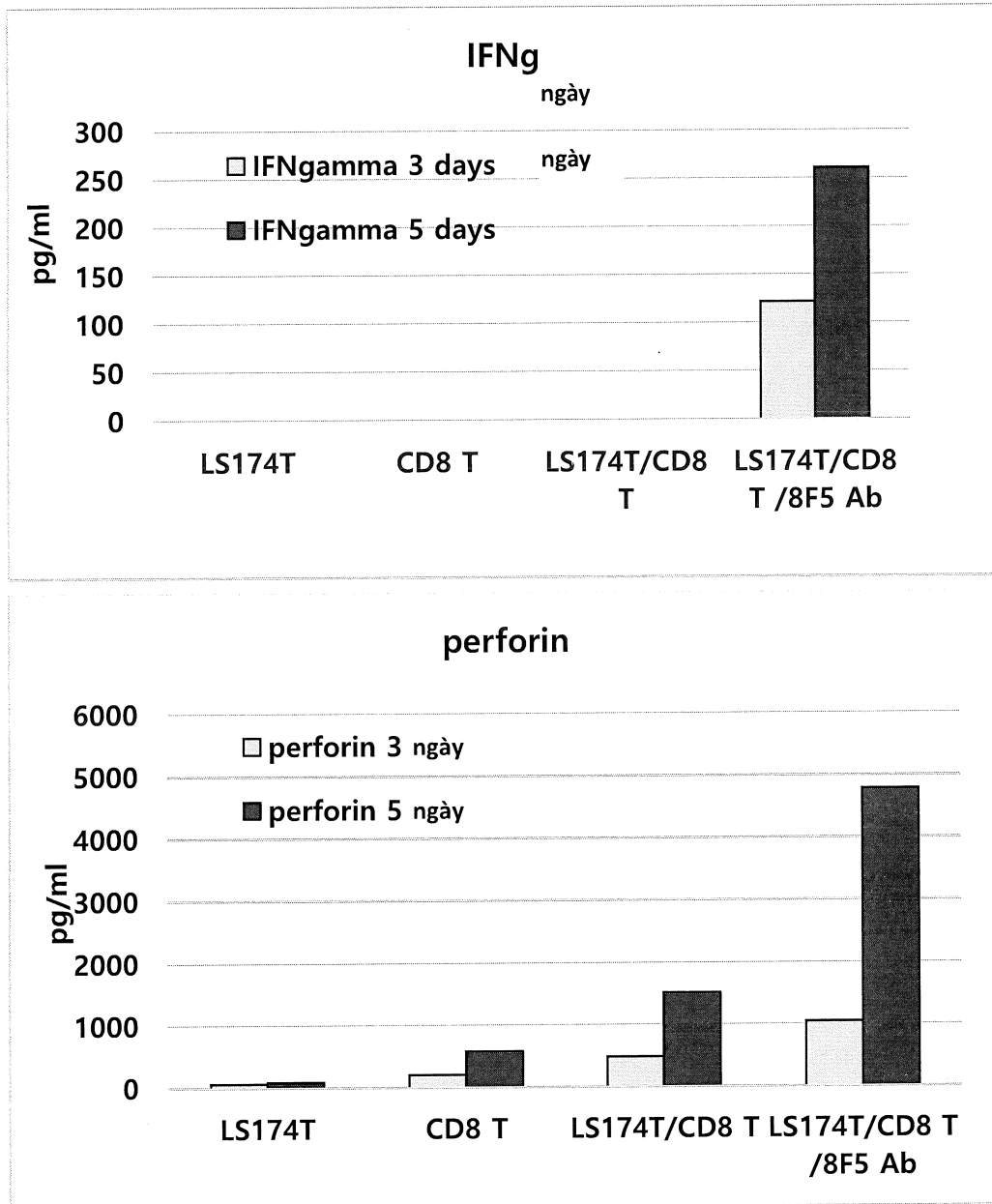
【Fig. 6c】



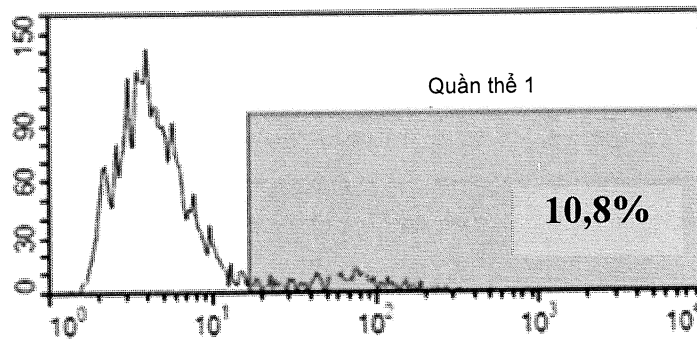
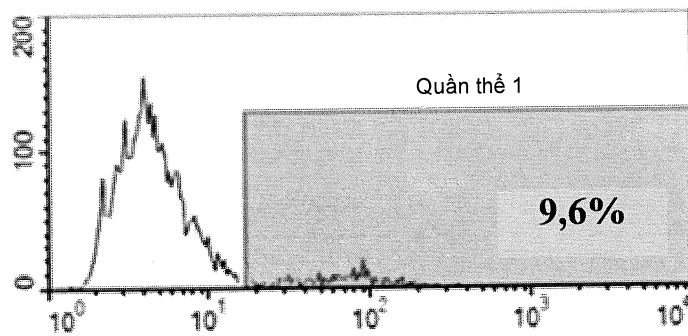
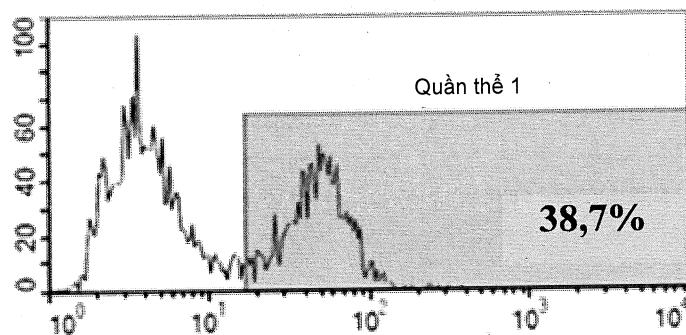
【Fig. 6d】



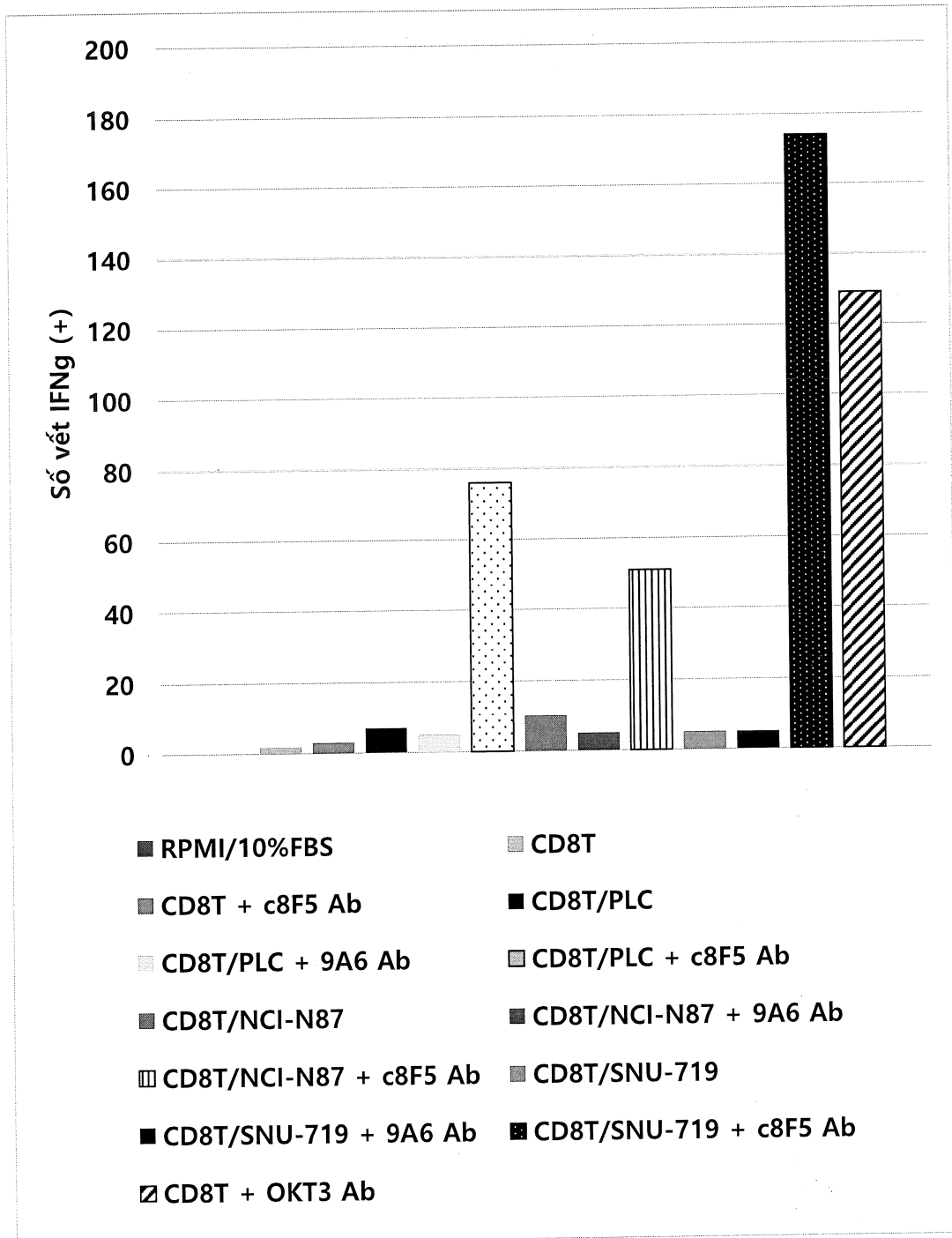
【Fig. 7a】



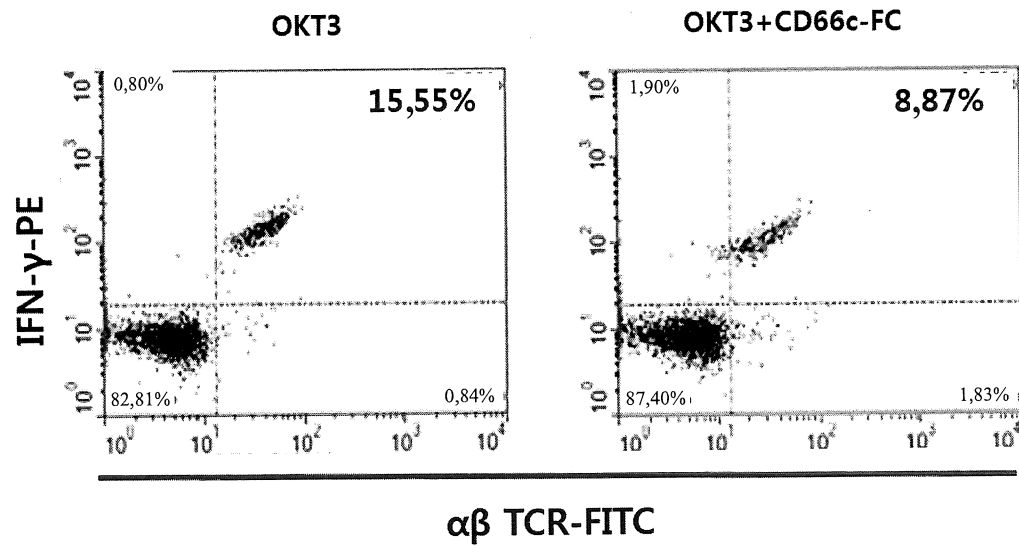
【Fig. 7b】

LS174T**CD8 T / LS174T****CD8 T / LS174T / 8F5 Ab**

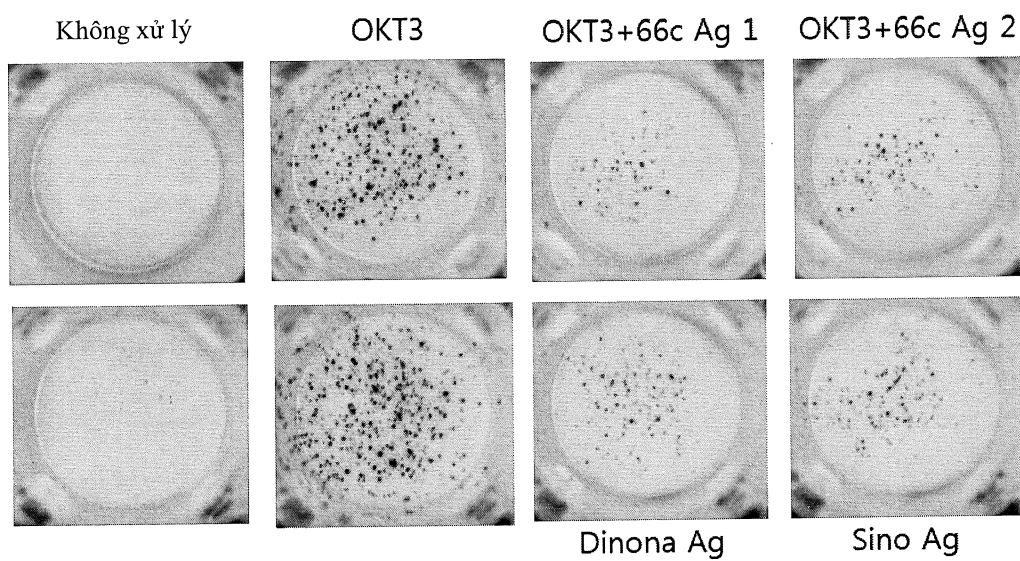
【Fig. 8】



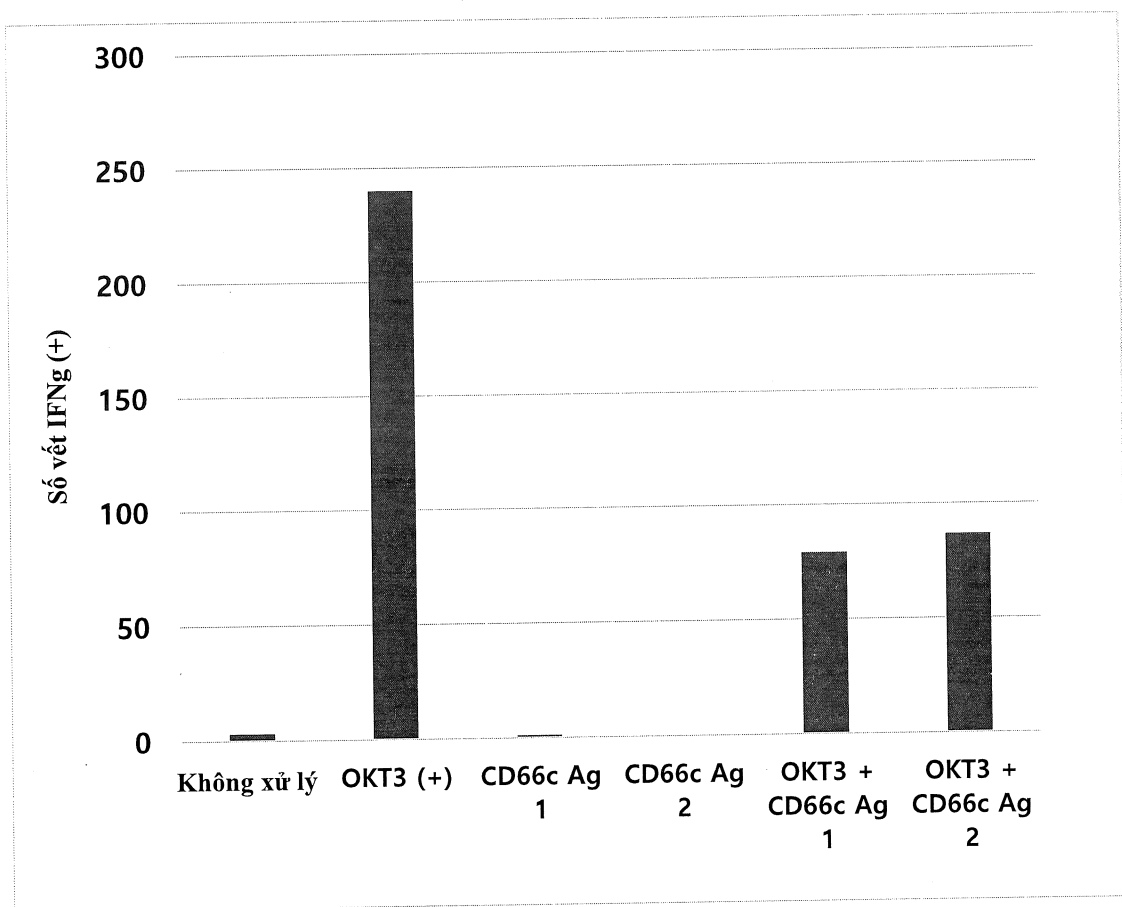
【Fig. 9a】



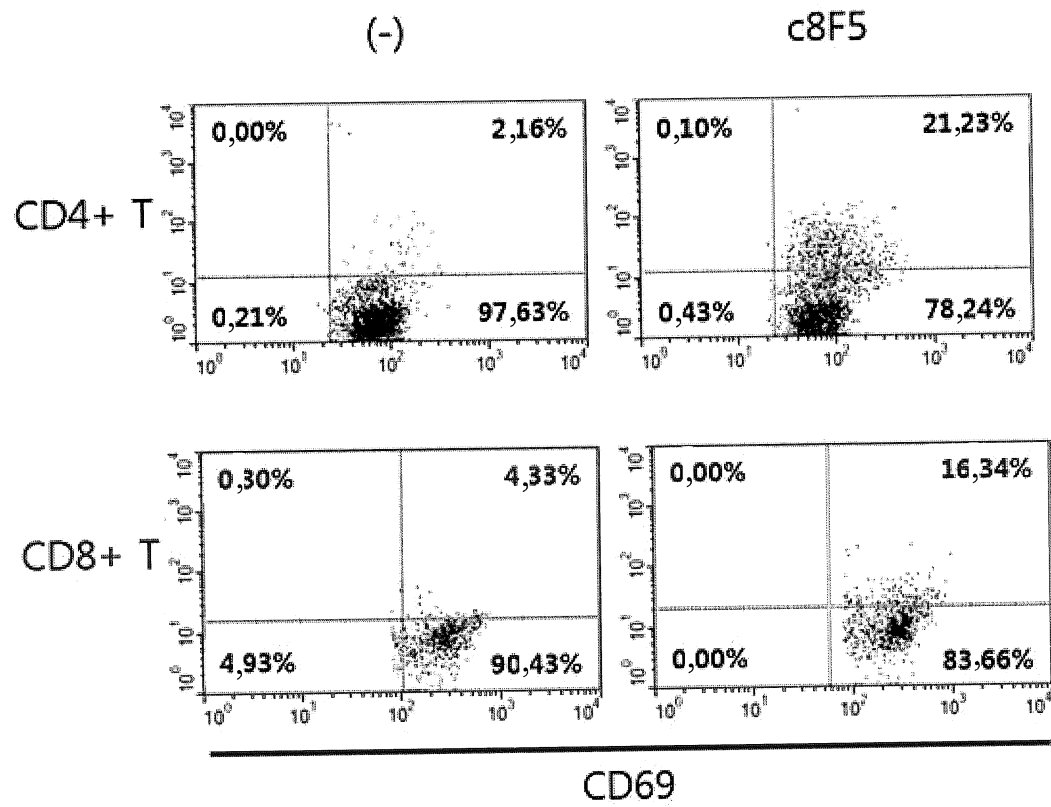
【Fig. 9b】



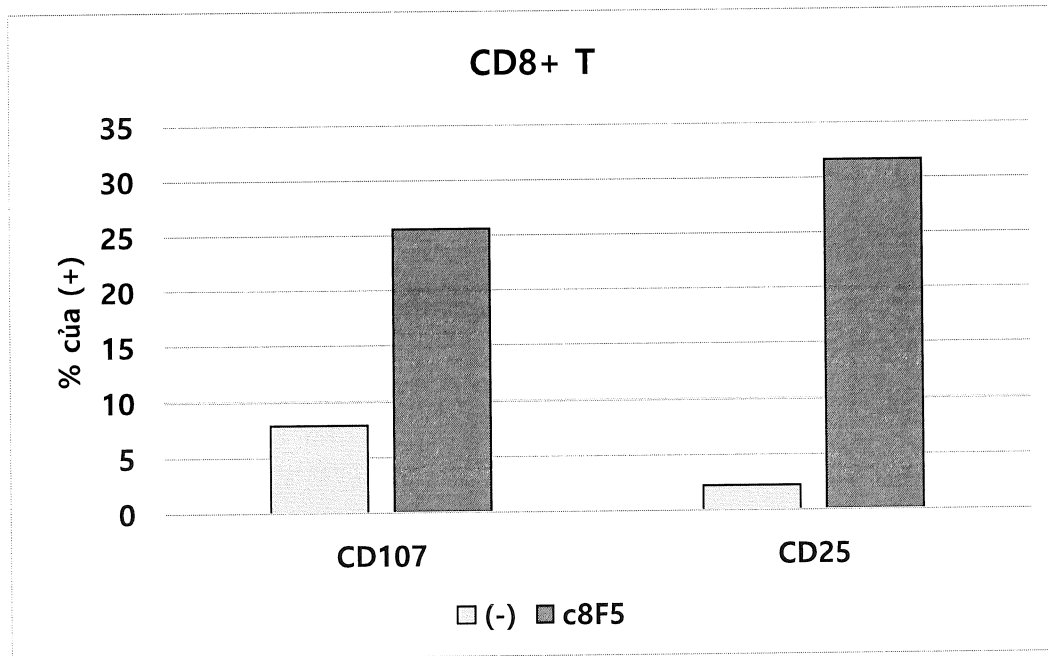
【Fig. 9c】



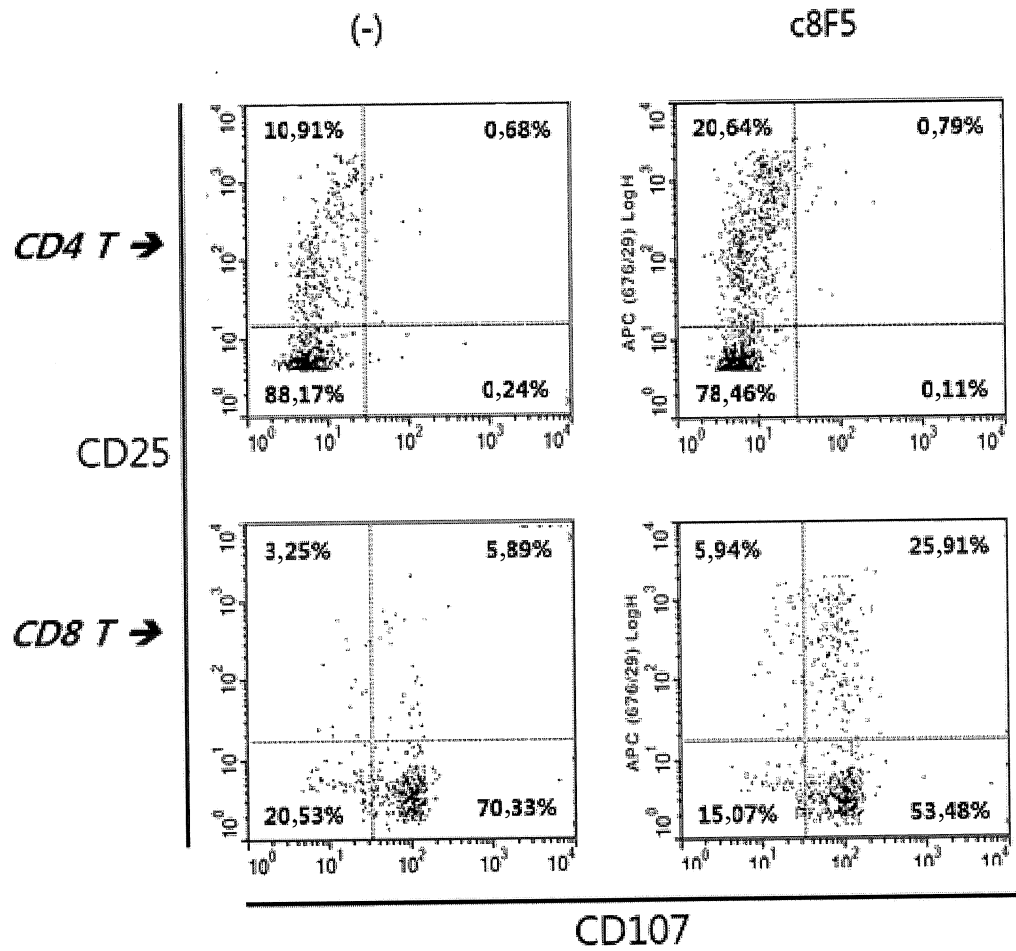
【Fig. 10a】



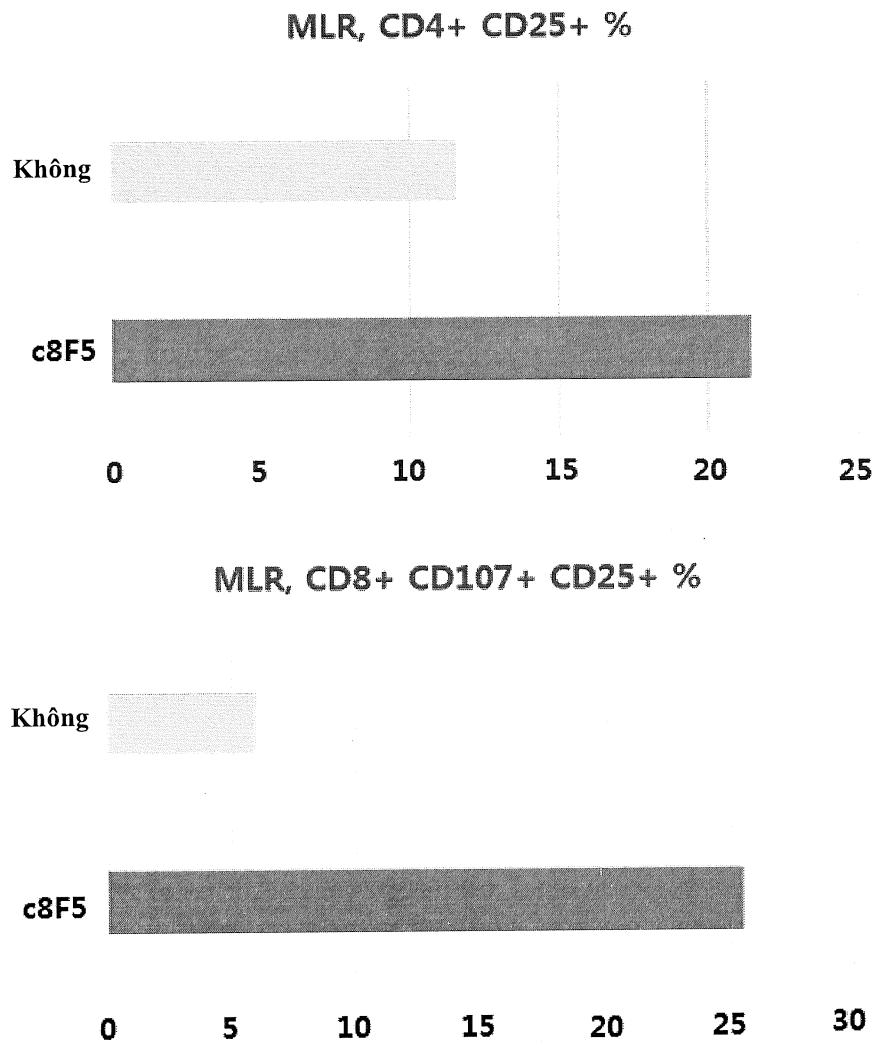
【Fig. 10b】



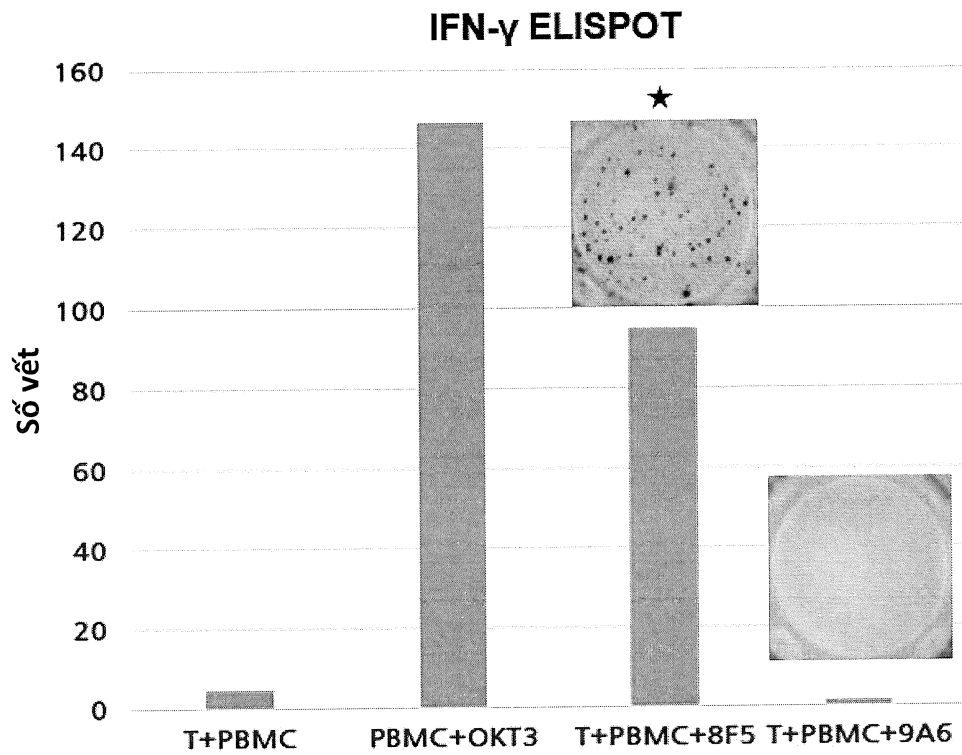
【Fig. 11a】



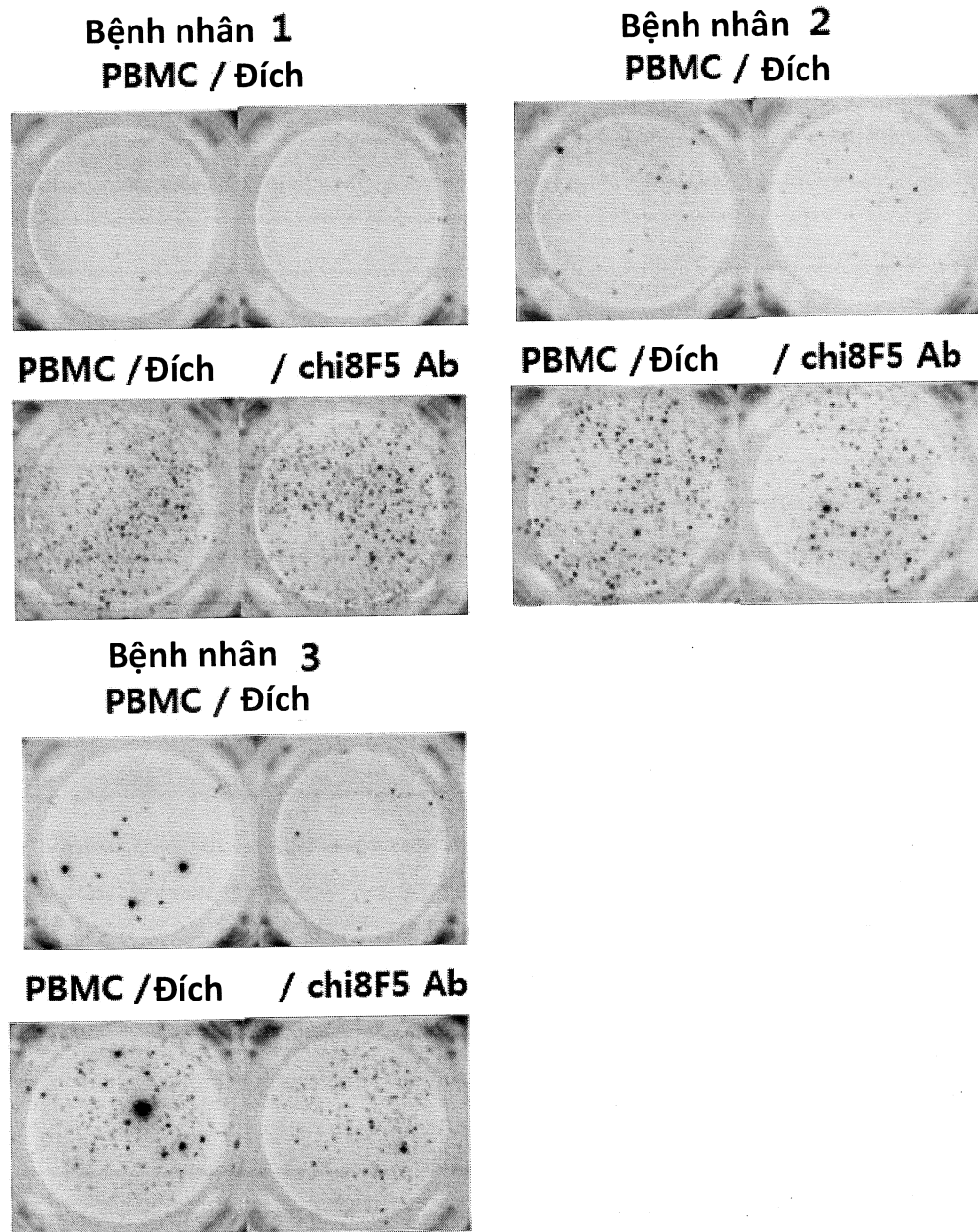
【Fig. 11b】



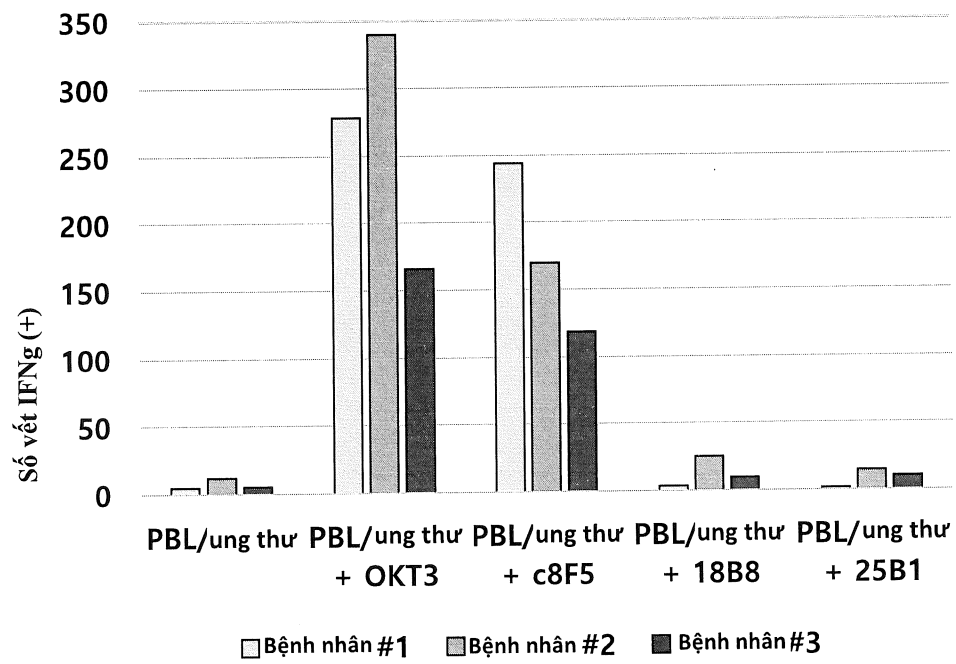
【Fig. 12a】



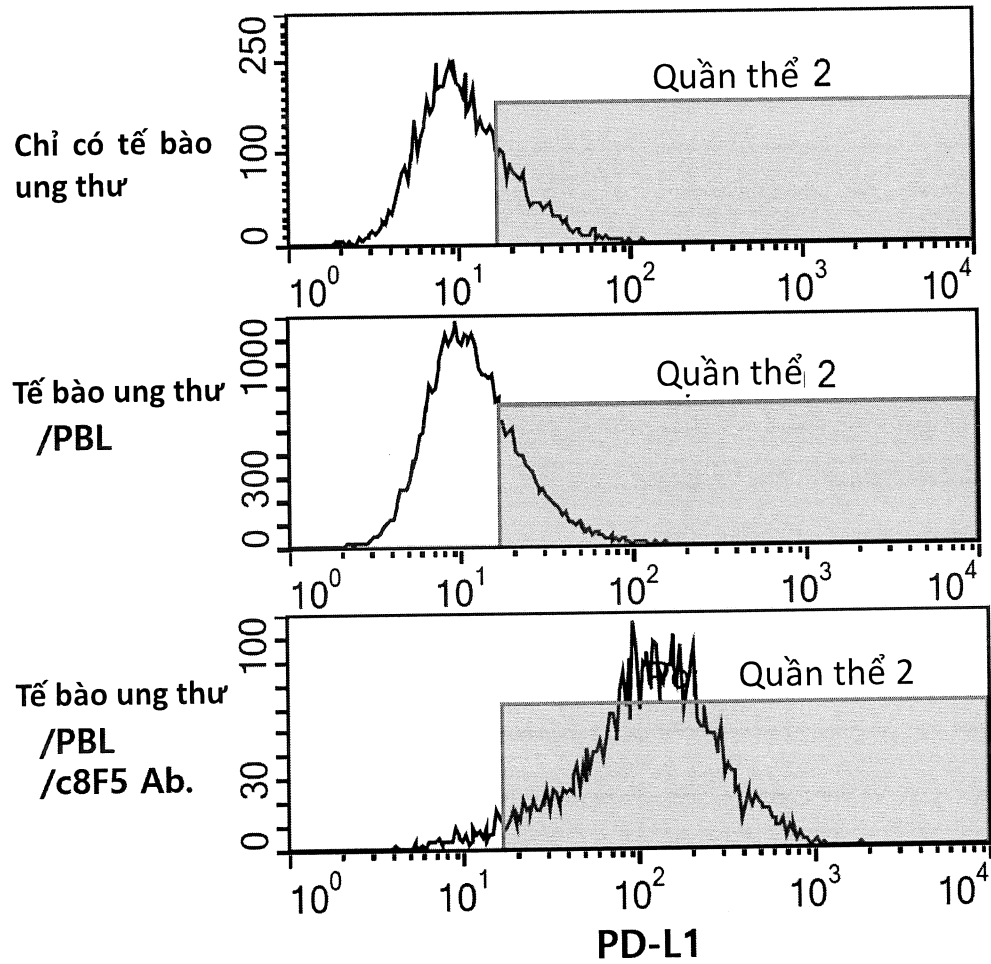
【Fig. 12b】



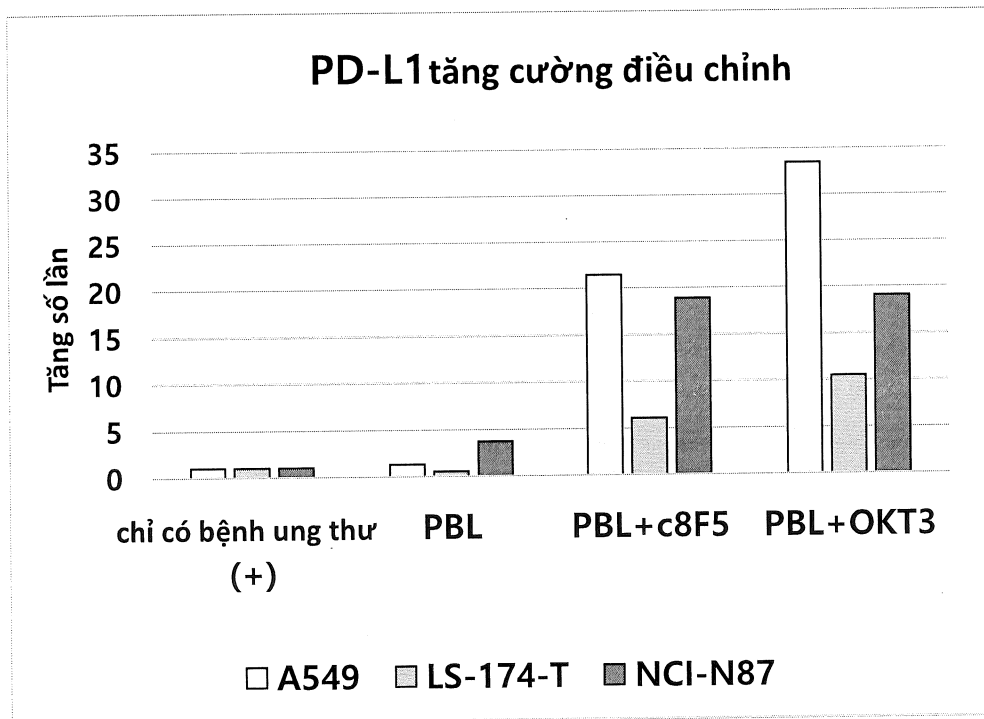
【Fig. 12c】



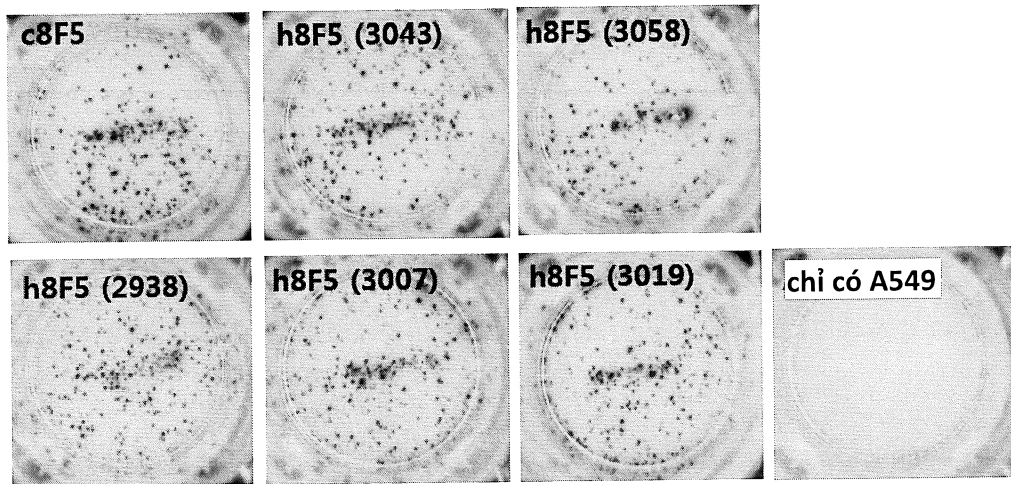
【Fig. 13a】



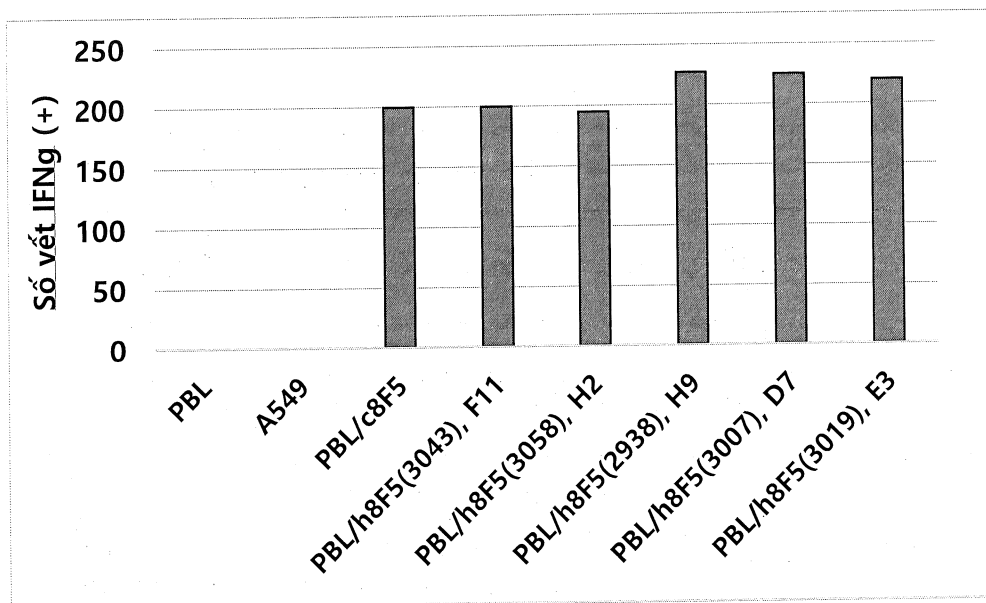
【Fig. 13b】



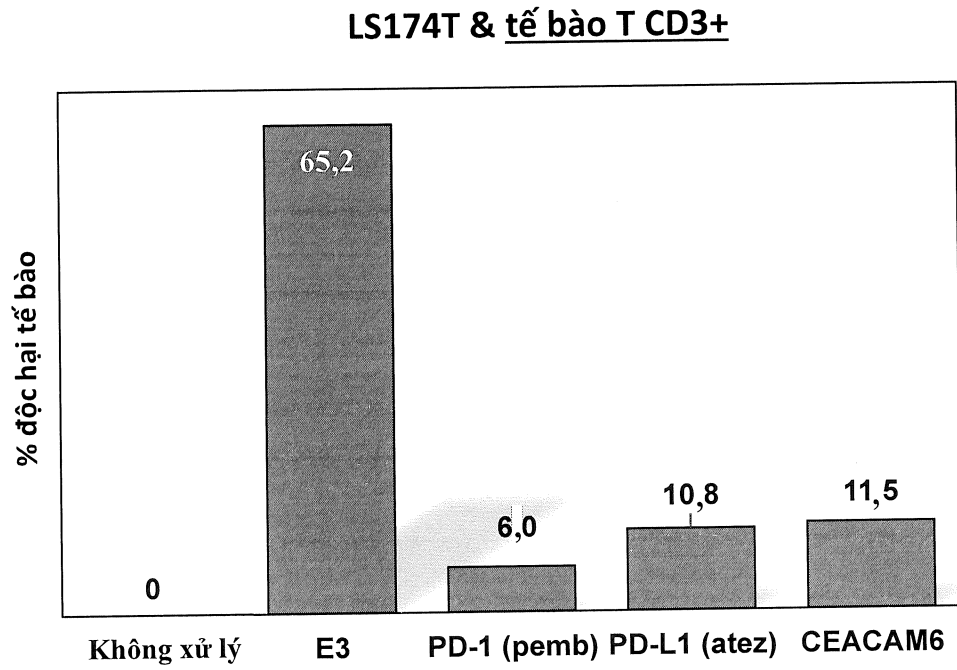
【Fig. 14a】



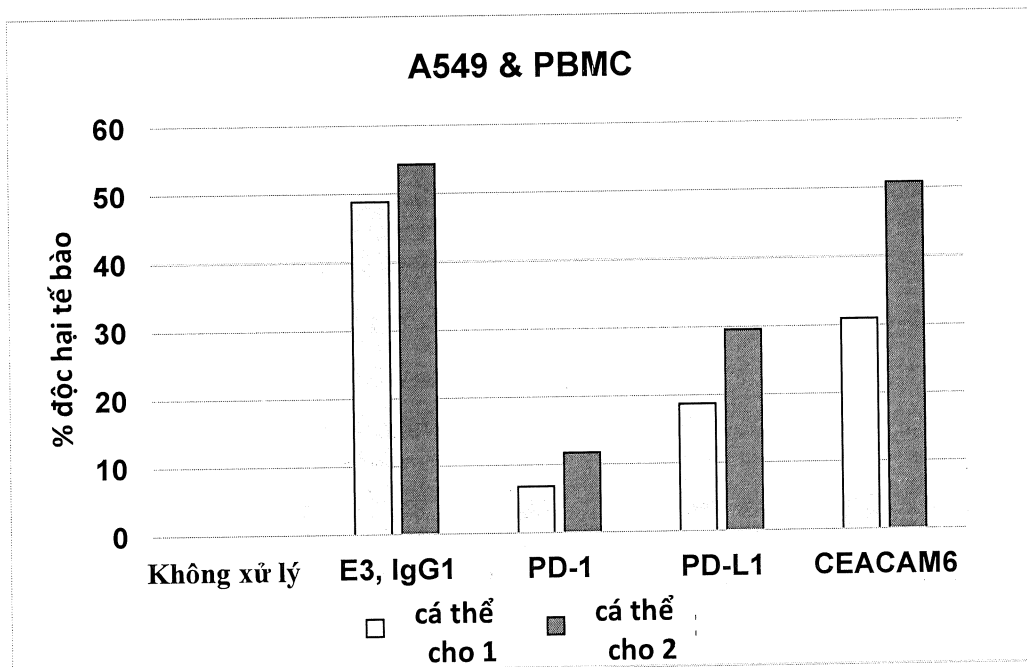
【Fig. 14b】



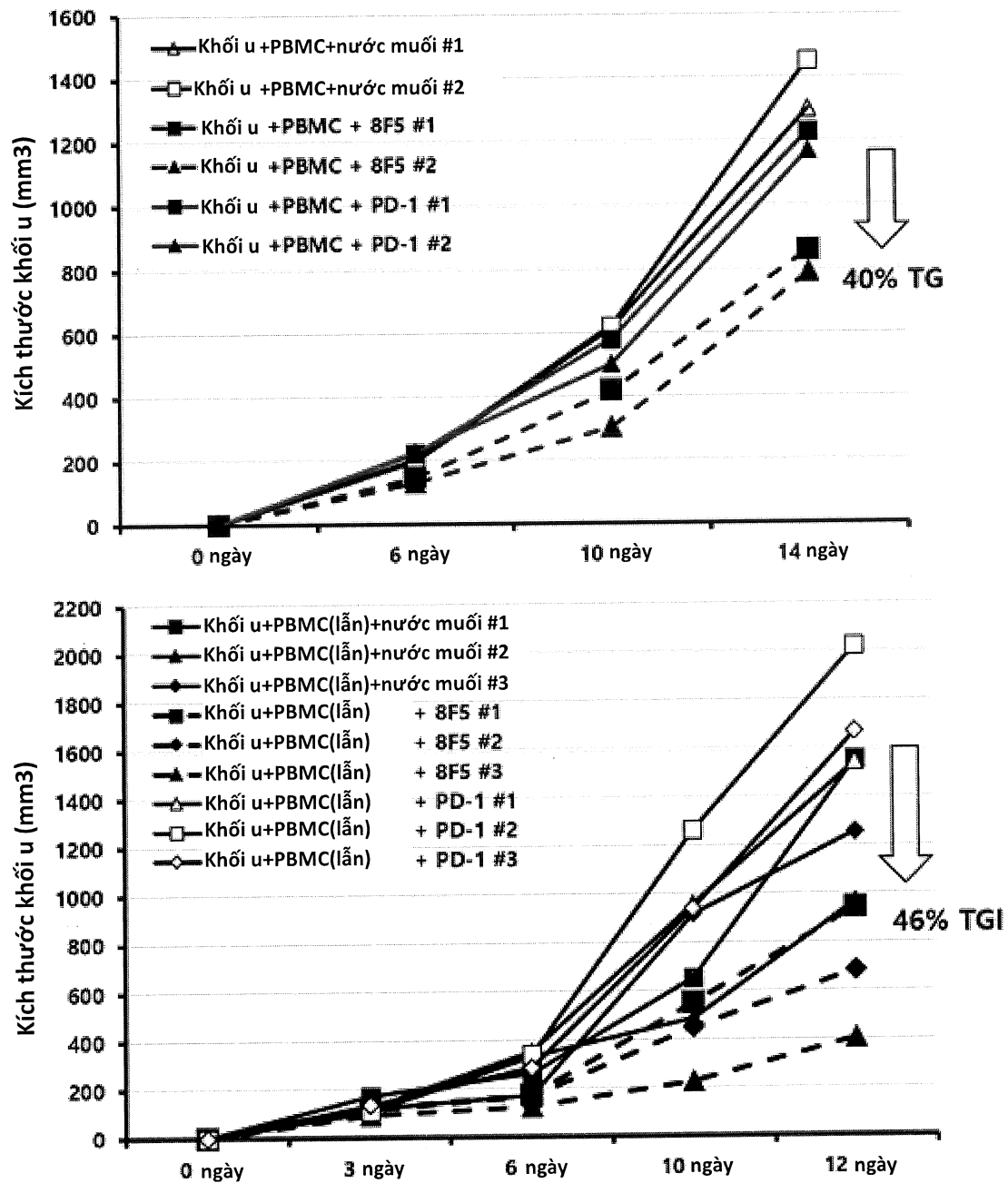
【Fig. 15a】



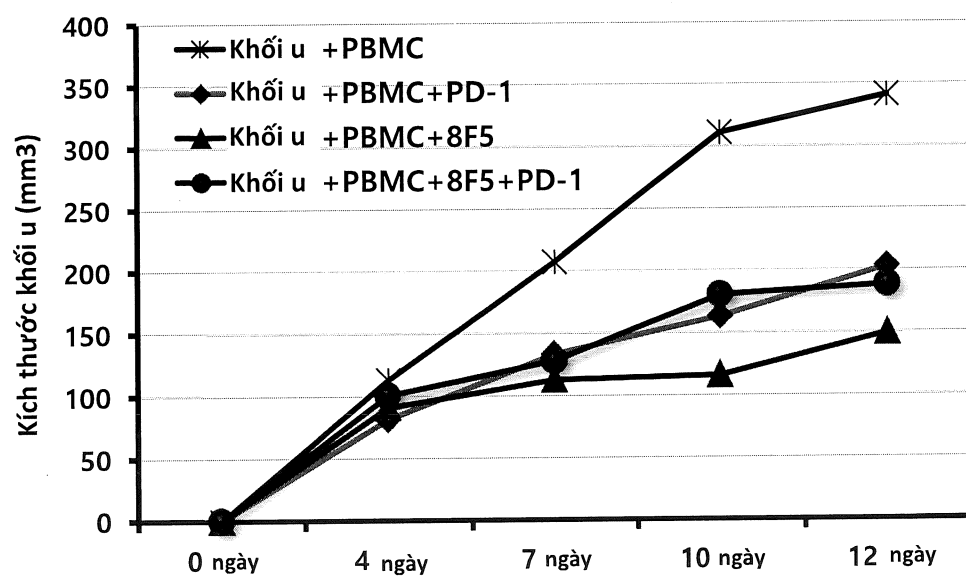
【Fig. 15b】



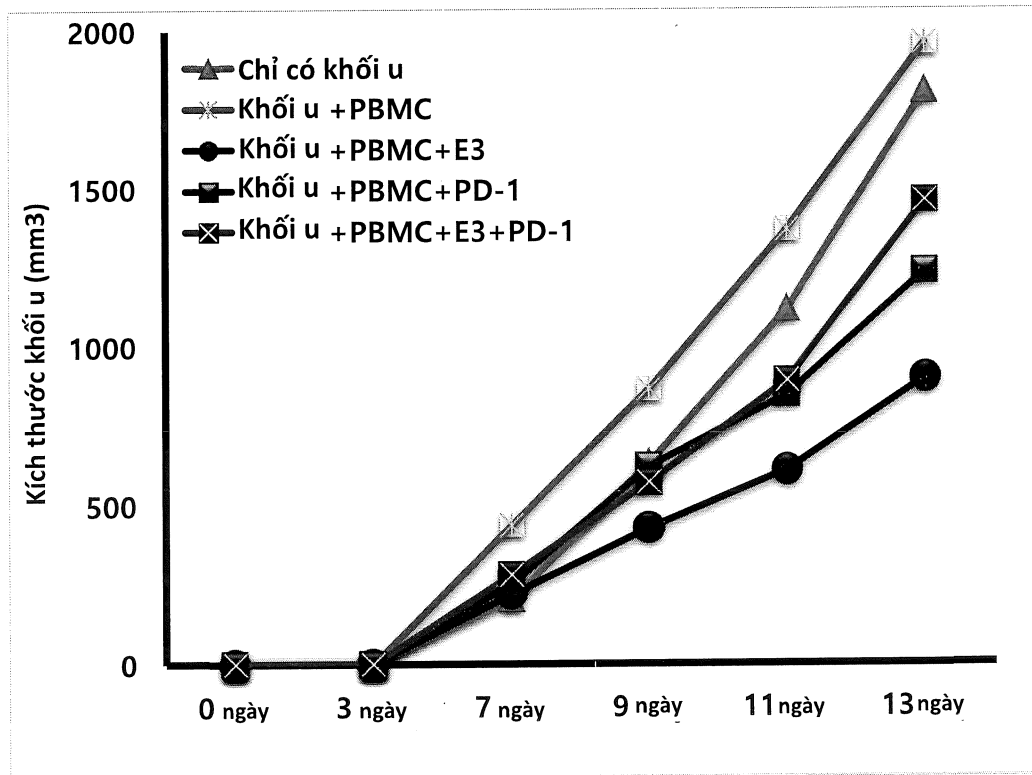
【Fig. 16a】



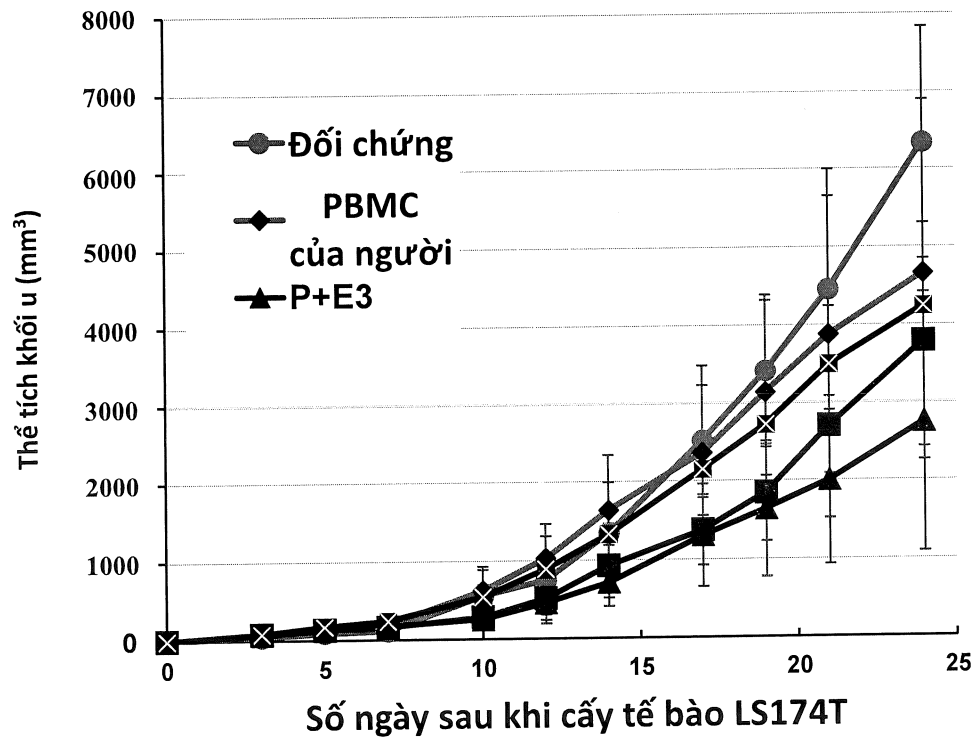
【Fig. 16b】



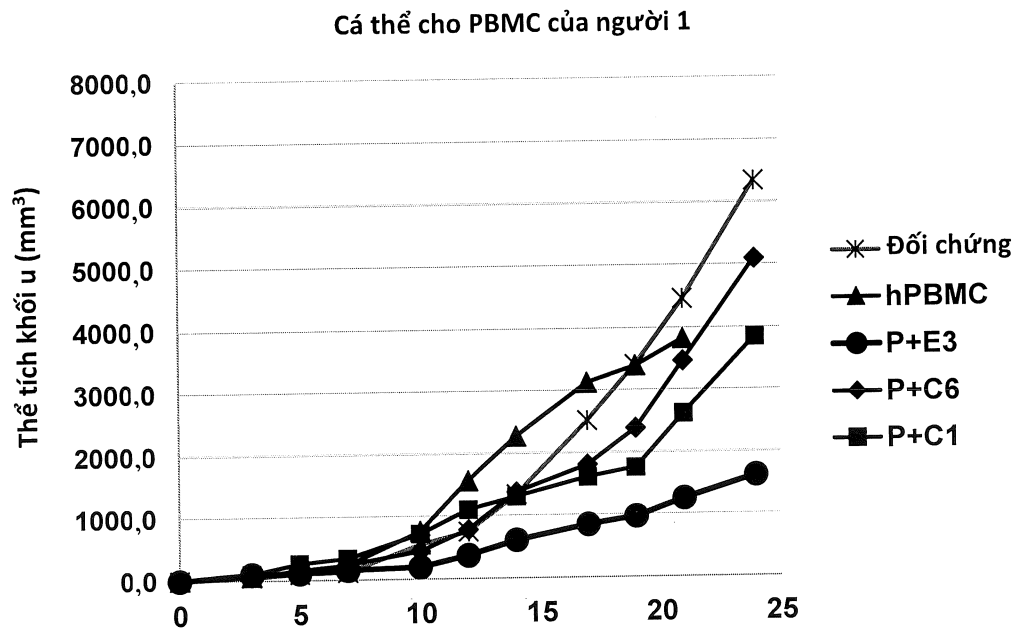
【Fig. 16c】



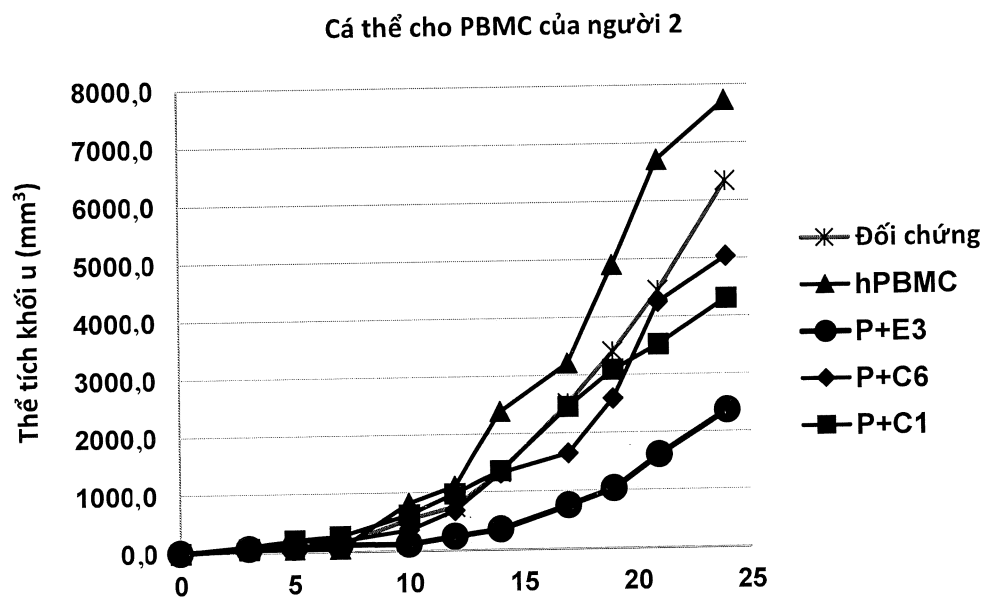
【Fig. 16d】



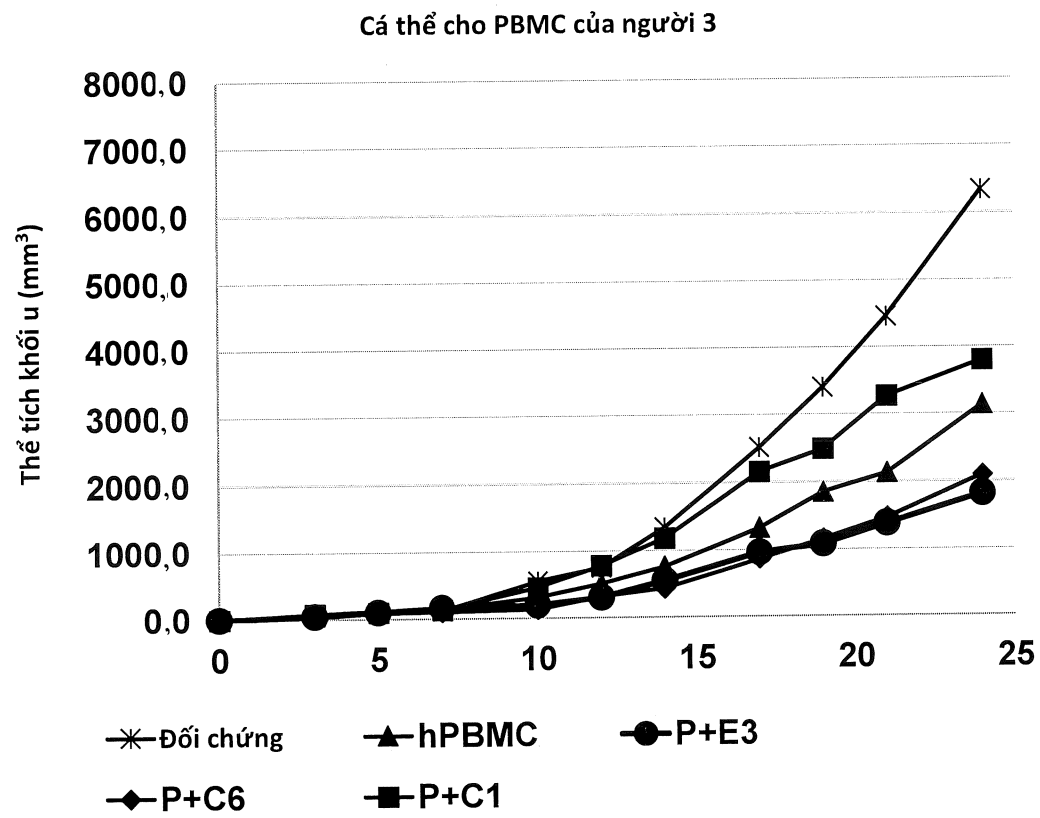
【Fig. 16e】



【Fig. 16f】



【Fig. 16g】



<110> Kumho HT, Inc.

<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD66c, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, VECTƠ TÁI TỔ HỢP VÀ TẾ BÀO TÁI TỔ HỢP

<130> OPP20174987KR

<150> KR 10-2016-0151359

<151> 2016-11-14

<160> 73

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-H1 của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khảm

<400> 1

Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr	Thr	Met	Asn
1				5					10		

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-H2 của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khảm

<400> 2

Leu	Ile	Asn	Pro	Phe	His	Gly	Gly	Thr	Val	Ser	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys
1				5					10					15	

Val

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-H3 của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khám

<400> 3

Val	Arg	Gly	Asp	Pro	Val	Arg	His	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Ala	Tyr
1				5					10				

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-L1 của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khám

<400> 4

Gly	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Tyr	Gly	Thr	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-L2 của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khám

<400> 5

Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp
1				5		

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-L3 của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khám

<400> 6

Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Val	Leu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khám

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Phe His Gly Gly Thr Val Ser Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Asp Pro Val Arg His Tyr Tyr Ala Leu Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c của chuột nhắt hoặc dạng khám

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H1 của kháng thể kháng CD66c được làm giống người

<400> 9
 Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr Met His
 1 5 10

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H2 của kháng thể kháng CD66c được làm giống người

<400> 10
 Leu Ile Asn Pro Phe Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L1 của kháng thể kháng CD66c được làm giống người

<400> 11
 Gly Ala Ser Glu Asn Val Tyr Gly Thr Leu Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L1 của kháng thể kháng CD66c được làm giống người

<400> 12
 Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Gly Thr Leu Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L3 của kháng thể kháng CD66c được làm giống người

<400> 13
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 128
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
(8F5-của người-VH5)

<400> 14

Phe His Met Ala Asn Val His Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
1 5 10 15

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala His
35 40 45

Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Phe His Gly Gly
50 55 60

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

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Asp Pro Val Arg His Tyr
100 105 110

Tyr Ala Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
(8F5-của người-VH6)

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
(8F5-của người-VH7)

<400> 16

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

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

<210>	17
<211>	121
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
(8F5-của người-VH10)

```

<400>      17
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1              5              10              15

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile
      35              40              45

Gly Leu Ile Asn Pro Phe His Gly Gly Thr Val Ser Asn Gln Arg Phe
      50              55              60

Lys Val Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Val Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
      65              70              75              80

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

Val Arg Gly Asp Pro Val Arg His Tyr Tyr Ala Leu Ala Tyr Trp Gly
      100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
 (8F5-của người-VH11)

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Phe Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Asp Pro Val Arg His Tyr Tyr Ala Leu Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
 (8F5-của người-VK5)

<400> 19

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

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống
 người
 (8F5-của người-VK7)

<400> 20

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người
 (8F5-của người-VK8)

<400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Gly Thr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 22
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c khảm

<400> 22

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
 20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được
 làm giống người (8F5-của người-VH5)

<400> 23

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 20

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được
 làm giống người (8F5-của người-VH6)

<400> 24

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
 20

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH7)

<400> 25

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
 20

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH10)

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 20

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH11)

<400> 27

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 20

<210> 28
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c khảm

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK5)

<400> 29
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK7)

<400> 30
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 1 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK8)

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c khám

<400> 32
Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH5)

<400> 33
Trp Val Arg Gln Ala His Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile Gly

1	5	10
<210>	34	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH6)	
<400>	34	
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile Gly		
1	5	10
<210>	35	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH7)	
<400>	35	
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
1	5	10
<210>	36	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH10)	
<400>	36	
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile Gly		
1	5	10
<210>	37	

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH11)

<400> 37

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c khám

<400> 38

Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK5)

<400> 39

Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK6)

<400> 40

Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 2 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK8)

<400> 41

Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 42

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c khám

<400> 42

Asn Gln Arg Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser
1 5 10 15

Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Val Arg
35

<210> 43

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH5)

<400> 43

Asn Gln Arg Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Thr
1 5 10 15

Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Val Arg
35

<210> 44

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH6)

<400> 44

Asn Gln Arg Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Thr
1 5 10 15

Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Val Arg
35

<210> 45

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH7)

<400> 45

Asn Gln Arg Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Thr

1 5 10 15
 Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Val Arg
 35

<210> 46
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH10)

<400> 46
 Asn Gln Arg Phe Lys Val Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Val Ser Thr
 1 5 10 15

Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Val Arg
 35

<210> 47
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH11)

<400> 47
 Ala Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr
 1 5 10 15

Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Val Arg
 35

<210> 48
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c khảm

<400> 48
 Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp
 20 25

<210> 49
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK5)

<400> 49
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp
 20 25

<210> 50
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK7)

<400> 50
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr

	1		5		10		15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp							
	20				25		
<210>	51						
<211>	26						
<212>	PRT						
<213>	Trình tự nhân tạo						
<220>							
<223>	Khung 3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK8)						
<400>	51						
Gly Met Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr							
1			5		10		15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp							
	20				25		
<210>	52						
<211>	11						
<212>	PRT						
<213>	Trình tự nhân tạo						
<220>							
<223>	Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c khám						
<400>	52						
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser							
1			5		10		
<210>	53						
<211>	11						
<212>	PRT						
<213>	Trình tự nhân tạo						
<220>							
<223>	Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH5)						
<400>	53						

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH6)

<400> 54
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH7)

<400> 55
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH10)

<400> 56
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VH11)

<400> 57
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c khảm

<400> 58
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile
 1 5 10

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK5)

<400> 59
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK7)

<400> 60

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Khung 4 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c được làm giống người (8F5-của người-VK8)

<400> 61

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 62

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD66c khảm

<400> 62

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact gactacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatcctt tccatggtgg tactgtctcc 180

aaccagaggt tcaaggtcaa ggccacatta actgtagaca agtcatcaa cacagcctac 240

atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcggtct attactgtgt aagaggtgac 300

ccggtccgcc attactatgc tttggcctac tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 63
 <211> 217
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polynucleotit mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD66c khảm

<400> 63
 gacatccaga tgactcagtc tccagcttca ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtg gagcaagtga gaatgtttac ggtacttttaa attggtatca gcggaaacag 120
 ggaaaatctc ctcagctcct gatctatggg gcaaccaact tggcagatgg catgtcatcg 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggtagacag tattctc 217

<210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 8F01 mồi của mảnh thứ nhất xuôi chiều

<400> 64
 attactcgag gccacatga a 21

<210> 65
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 8F02 mồi của mảnh thứ nhất ngược chiều

<400> 65
 agttgaagcg ctgctcacag tca 23

<210> 66

<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	8F03 mỗi của mảnh thứ hai xuôi chiều	
<400>	66	
	gtgagcagcg cttcaactaa ggg	23
<210>	67	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	3E04 mỗi của mảnh thứ hai ngược chiều	
<400>	67	
	agtcgaattc tcatttccca ggagag	26
<210>	68	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	8F04 mỗi của mảnh thứ nhất ngược chiều	
<400>	68	
	agttgaagca gaagacactg tca	23
<210>	69	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	8F05 mỗi của mảnh thứ nhất xuôi chiều	
<400>	69	
	gtgtcttctg cttcaactaa ggg	23

<210>	70	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	3E01 mỗi của mảnh thứ nhất xuôi chiều	
<400>	70	
	attactcgag gccaccatga agtggg	26
<210>	71	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	8F06 mỗi của mảnh thứ nhất ngược chiều	
<400>	71	
	aacagtcgc ttgatctcca gct	23
<210>	72	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	3EL02(2) mỗi của mảnh thứ hai xuôi chiều	
<400>	72	
	gagatcaagc ggactgttgc tgc	23
<210>	73	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	3E08 mỗi của mảnh thứ hai ngược chiều	

<400> 73

attagaattc tcagcactcg ccgcgg

26