



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

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

(11)



1-0039280

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 35/00; A61P 37/04; (13) B
G01N 33/577; C12N 1/21; C12N 15/13;
C12N 15/63; C12N 5/10; A61K 39/395;
C07K 19/00

(21) 1-2017-00481

(22) 31/07/2015

(86) PCT/CN2015/085721 31/07/2015

(87) WO 2016/015675 04/02/2016

(30) 201410377352.9 01/08/2014 CN

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/07/2017 352A

(73) AKESO BIOPHARMA, INC. (CN)

6 Shennong Blvd, Torch Developmental Zone Zhongshan, Guangdong 528437,
China

(72) LI, Baiyong (CN); XIA, Yu (CN); WANG, Zhongmin (CN); ZHANG, Peng (CN);
PANG, Xinghua (CN).

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

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG KHÁNG NGUYÊN KẾT HỢP LYMPHO
BÀO T GÂY ĐỘC TẾ BÀO 4 (CTLA4) HOẶC MẠNH LIÊN KẾT KHÁNG
NGUYÊN CỦA CHÚNG, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế thuộc lĩnh vực trị liệu khối u và miễn dịch học phân tử, và đề xuất kháng thể
đơn dòng kháng kháng nguyên kết hợp lympho bào T gây độc tế bào 4 (CTLA4) hoặc
mạnh liên kết kháng nguyên của chúng, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa kháng
thể này. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể phong bế sự liên kết của CLTA4 với B7,
làm thuyên giảm sự ức chế miễn dịch trên cơ thể bởi CTLA4, và hoạt hóa lympho bào T.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực trị liệu khối u và miễn dịch học phân tử. Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng CTLA4 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, dược phẩm chứa chúng, trình tự mã hóa của chúng và phương pháp và việc sử dụng trong chẩn đoán, ngăn ngừa, trị liệu và/hoặc trị liệu hỗ trợ sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên kết hợp lympho bào T gây độc tế bào 4 (viết tắt là CTLA4) có mối quan hệ rất gần gũi với phân tử CD28 về cấu trúc gen, vị trí nhiễm sắc thể, độ tương đồng trình tự và sự biểu hiện gen. Cả hai phân tử này đều là thụ thể của phân tử đồng kích thích B7, được biểu hiện chủ yếu trên bề mặt của các tế bào T đã hoạt hóa. Tuy nhiên, do tín hiệu đồng kích thích của sự hoạt hóa lympho bào, CTLA4 có chức năng trái ngược với CD28. Sau khi liên kết với B7, CTLA4 có thể ức chế sự hoạt hóa tế bào T của chuột và người, đóng vai trò điều hòa âm trong việc hoạt hóa tế bào T.

mAb CTLA4 hoặc phối tử CTLA4 có thể ngăn chặn CTLA4 liên kết với phối tử tự nhiên của nó, nhờ đó phong bế sự tải nạp tín hiệu điều hòa âm tế bào T bằng CTLA4 và tăng cường tính đáp ứng của tế bào T đối với các kháng nguyên khác nhau. Theo khía cạnh này, kết quả từ các nghiên cứu in vivo và in vitro gần như có tính phối hợp. Hiện tại, có một số CTLA4 mAb (10D1, 11.2.2) được thử nghiệm trong các thử nghiệm lâm sàng để điều trị ung thư tuyến tiền liệt, ung thư bàng quang, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư đại dạ dày-ruột non, ung thư gan, u hắc sắc tố ác tính, v.v. (CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Grosso JF., Jure-Kunkel

MN., Cancer Immun. 2013; 13:5. Epub 2013 Jan 22; US 6984720 B1; và US 6682736 B1). Trong số này, 10D1 và 11.2.2 được đánh giá là các kháng thể đơn dòng kháng CTLA4 có hiệu quả tốt nhất.

Interleukin 2 (IL-2) được sản xuất bởi tế bào T. Đây là yếu tố sinh trưởng điều hòa nhóm phụ của tế bào T. Đây cũng là yếu tố quan trọng điều biến đáp ứng miễn dịch. Nó có thể xúc tiến và hoạt hóa sự mở rộng của tế bào B, và liên quan đến phản ứng kháng thể, sự tạo huyết và sự kiểm soát khối u. IL-2 tái tổ hợp của người đã được US FDA phê chuẩn để điều trị khối u ác tính (bao gồm u hắc sắc tố, khối u thận, v.v.). Nó cũng đang được nghiên cứu lâm sàng để điều trị sự lây nhiễm virus mạn tính (Pharmacologic administration of interleukin-2. Chavez, A.R., et al., Ann N Y Acad Sci, 2009. 1182: 14-27).

Giống như các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chức năng của tế bào T, CTLA4 và CTLA4 mAb có thể tạo ra tác dụng trị liệu cụ thể đối với các bệnh bằng cách can thiệp vào vi môi trường miễn dịch trong cơ thể. Chúng có hiệu quả cao và khắc phục được khiếm khuyết của thuốc truyền thống, mở ra con đường trị liệu gen mới. CTLA4 và CTLA4 mAb được thử nghiệm trong các thử nghiệm và các giai đoạn khác nhau của các thử nghiệm lâm sàng. Ví dụ, trong các bệnh tự miễn, chúng ức chế một cách hiệu quả tính đáp ứng tăng đường khí đạo trong mô hình thử nghiệm ở động vật về bệnh hen, ngăn ngừa sự phát triển của bệnh thấp khớp, điều tiết tính dung nạp miễn dịch đối với dị ghép trong cơ thể, và các tác dụng khác. Mặt khác, mặc dù trị liệu gen sinh học đã cho thấy tác dụng bất lợi bất kỳ trong các thử nghiệm lâm sàng thời gian ngắn, cần phải chú ý đến hiệu quả tiềm năng sau khi áp dụng trong thời gian dài. Ví dụ, việc phong bế quá mức sự truyền tín hiệu CTLA4-B7 bởi CTLA4 mAb có thể dẫn đến sự phát triển các bệnh tự miễn. Vì các kháng thể có thể liên kết đặc hiệu với phối tử của chúng và kích thích sự tan tế bào đích hoặc phong bế sự tiến triển của bệnh, sự phát triển và sử dụng các thuốc dựa trên kháng thể, đặc biệt là các kháng thể được làm giống như của người có tầm quan trọng đáng kể trong điều trị lâm sàng các khối u ác tính và các bệnh miễn dịch khác ở người.

Hiện nay, vẫn có nhu cầu phát triển kháng thể mới phong bế sự liên kết của CTLA4 với B7, và kháng thể được làm giống như của người của chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sau các nghiên cứu kỹ lưỡng và các công việc sáng tạo bởi các tác giả sáng chế, CTLA4 tái tổ hợp được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ biểu hiện tế bào động vật có vú, và được sử dụng làm kháng nguyên để gây miễn dịch cho chuột. Tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào lách chuột với tế bào u tủy. Sau khi sàng lọc nhiều mẫu, các tác giả sáng chế đã thu được dòng tế bào lai có khả năng tiết và sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu mà liên kết đặc hiệu với CTLA4 và có thể phong bế liên kết của CTLA4 với B7 một cách hiệu quả. Ngoài ra, các kháng thể được làm giống như của người được tạo ra. Do đó, các sáng chế sau được đề xuất.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể đơn dòng này chứa vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) được chọn từ các vùng sau:

HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27,

HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, và

HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 29;

và/hoặc

LCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 30,

LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, và

LCDR3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, và SEQ ID NO: 34.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, trong đó:

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng được chọn từ SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, và SEQ ID NO: 18;

và/hoặc

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng được chọn từ SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, và SEQ ID NO: 24.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, trong đó:

kháng thể đơn dòng này chứa:

(1) VH như được nêu trong SEQ ID NO: 6 và VL như được nêu trong SEQ ID NO: 8;

(2) VH như được nêu trong SEQ ID NO: 10 và VL như được nêu trong SEQ ID NO: 12;

(3) VH như được nêu trong SEQ ID NO: 14 và VL như được nêu trong SEQ ID NO: 16;

(4) VH như được nêu trong SEQ ID NO: 18 và VL như được nêu trong SEQ ID NO: 20;

(5) VH như được nêu trong SEQ ID NO: 14 và VL như được nêu trong SEQ ID NO: 22; hoặc

(6) VH như được nêu trong SEQ ID NO: 14 và VL như được nêu trong SEQ ID NO: 24.

Theo sáng chế, các nhóm từ (1) đến (6) trên đây thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 8D2/8D2(Re), 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17, một cách tương ứng.

Cụ thể, methionin (Met) ở vị trí 18 trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, và SEQ ID NO: 14 độc lập được thể bằng axit amin được chọn từ các axit amin sau: Leuxin (Leu), Valin (Val), Isoleuxin (Ile), hoặc Alanin (Ala).

Các thuốc trị liệu dựa trên kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng (MAB) đã đạt được hiệu quả tuyệt vời trong điều trị một số bệnh. Phương pháp truyền thống để thu được kháng thể trị liệu như vậy là gây miễn dịch động vật bằng kháng nguyên, thu được kháng thể chống lại kháng nguyên này từ động vật đã được gây miễn dịch, hoặc cải thiện kháng thể có ái lực thấp với kháng nguyên bằng sự trưởng thành ái lực. Tuy nhiên, phương pháp này tốn thời gian và tốn nhân công, và thường không nhắm đích được epitop đặc hiệu trên kháng nguyên.

Sự liên kết với kháng nguyên phụ thuộc vào vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng; vùng biến đổi của mỗi chuỗi chứa ba vùng siêu biến đổi, còn được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) (chuỗi nặng (H) chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3, và chuỗi nhẹ (L) chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3; xem phần giải thích về các vùng này trong ấn phẩm: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Vol. 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

Trình tự axit amin của CDR trong trình tự kháng thể đơn dòng của các phương án từ (1) đến (6) trên đây được phân tích bằng các biện pháp kỹ thuật đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng phép phân tích cơ sở dữ liệu VBASE2. Các kết quả được cung cấp dưới đây.

(1) Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện dưới đây:

HCDR1: GFTFSDNW	(SEQ ID NO: 27),
HCDR2: IRNKPYNYET	(SEQ ID NO: 28),
HCDR3: TAQFAY	(SEQ ID NO: 29).

Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

LCDR1: ENIYGG	(SEQ ID NO: 30),
LCDR2: GAT	(SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(2) Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện dưới đây:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(3) Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện dưới đây:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),

LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(4) Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện dưới đây:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),

HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),

HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),
 LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),
 LCDR3: QNVLRSPFT (SEQ ID NO: 32).

(5) Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện dưới đây:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),
 HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),
 HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),
 LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),
 LCDR3: QNVLSRHPG (SEQ ID NO: 33).

(6) Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện dưới đây:

HCDR1: GFTFSDNW (SEQ ID NO: 27),
 HCDR2: IRNKPYNYET (SEQ ID NO: 28),
 HCDR3: TAQFAY (SEQ ID NO: 29).

Trình tự axit amin của 3 CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

LCDR1: ENIYGG (SEQ ID NO: 30),
 LCDR2: GAT (SEQ ID NO: 31),
 LCDR3: QNVLSSRPG (SEQ ID NO: 34).

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng được chọn từ Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, mảnh vùng quyết định tính hỗ trợ, kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể thể đôi.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, trong đó kháng thể đơn dòng này liên kết với CTLA4 protein với K_D ít hơn khoảng 10^{-5} M, ví dụ, ít hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc ít hơn.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, trong đó kháng thể đơn dòng này chứa vùng không phải CDR, và vùng không phải CDR này là từ kháng thể của loài khác với chuột, ví dụ, người.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế là kháng thể đơn dòng kháng CTLA4 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà có thể liên kết đặc hiệu với CTLA4.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế để sử dụng trong ngăn ngừa và/hoặc trị liệu và/hoặc trị liệu hỗ trợ và/hoặc chẩn đoán khối u; cụ thể, khối u được chọn từ u hắc sắc tố, khối u thận, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư bàng quang, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư đại dạ dày-ruột non, và ung thư gan/ung thư thuộc gan.

Kháng thể đơn dòng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế để sử dụng để:

phong bế sự liên kết của CTLA4 với B7,

điều hòa (ví dụ, điều hòa giảm) hoạt tính của CTLA4 hoặc mức CTLA4,

làm thuyên giảm sự ức chế miễn dịch trên cơ thể bởi CTLA4, hoặc

làm tác nhân hoạt hóa lympho bào T hoặc làm tăng sự biểu hiện của IL-2 trong lympho bào T.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic được phân lập, chứa trình tự axit nucleic có khả năng mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chứa CDR với trình tự axit amin SEQ ID NO: 27-29;

cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, hoặc SEQ ID NO: 18;

cụ thể hơn, phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, hoặc SEQ ID NO: 17.

Sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Phân tử axit nucleic này có thể được phân lập từ tế bào lai, hoặc thu được thông qua kỹ thuật thiết kế gen tái tổ hợp hoặc phương pháp tổng hợp hóa học.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic được phân lập, chứa trình tự axit nucleic có khả năng mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chứa:

1) CDR với trình tự axit amin SEQ ID NO: 30-32;

2) CDR với trình tự axit amin SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 33; hoặc

3) CDR với trình tự axit amin SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 34;

cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, hoặc SEQ ID NO: 24;

cụ thể hơn, phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, hoặc SEQ ID NO: 23.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vectơ, chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo phương án bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế. Vectơ theo sáng chế có thể là vectơ tách dòng hoặc vectơ biểu hiện. Theo phương án được ưu tiên, vectơ theo sáng chế là, ví dụ, plasmid, cosmit, thể thực khuẩn, coemit, hoặc dạng tương tự.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ, chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo phương án bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế, hoặc vectơ theo sáng chế. Các tế bào chủ như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào sinh vật không có nhân điển hình như tế bào E. coli, và tế bào sinh vật có nhân điển hình như tế bào nấm men, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào động vật (như tế bào động vật có vú, bao gồm tế bào chuột, tế bào của người, hoặc các tế bào tương tự). Các tế bào theo sáng chế cũng có thể là dòng tế bào, như tế bào 293T.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp và thu hồi kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể liên hợp, chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng và gốc được liên hợp, trong đó kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, và gốc được liên hợp là nhãn phát hiện được. Cụ thể, gốc được liên hợp là chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất sinh màu, hoặc enzyme (ví dụ, peroxidaza cây cải ấu ven biển).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến bộ kit, chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, hoặc thể liên hợp theo sáng chế;

cụ thể, bộ kit này còn chứa kháng thể thứ hai, kháng thể này nhận biết một cách đặc hiệu kháng thể đơn dòng đã nêu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng; tùy ý, kháng thể thứ hai này còn chứa nhãn phát hiện được, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất sinh màu, hoặc enzym (ví dụ, peroxidaza cây cải ổi ven biển).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế trong điều chế bộ kit để sử dụng trong việc phát hiện sự có mặt hoặc mức CTL4 trong mẫu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế; tùy ý, dược phẩm này còn chứa chất mang và/hoặc tá dược được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế trong bào chế thuốc để sử dụng trong ngăn ngừa và/hoặc trị liệu và/hoặc trị liệu hỗ trợ và/hoặc chẩn đoán khối u; cụ thể, khối u được chọn từ u hắc sắc tố, khối u thận/khối u thuộc thận, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư bàng quang, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư đại dạ dày-ruột non, và ung thư gan/ung thư thuộc gan.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế trong điều chế các tác nhân sau:

tác nhân phát hiện sự có mặt hoặc mức CTL4 trong mẫu,

tác nhân phong bế sự liên kết của CTLA4 với B7,

tác nhân điều hòa (ví dụ, điều hòa giảm) hoạt tính của CTLA4 hoặc mức CTLA4,

tác nhân làm thuyên giảm sự ức chế miễn dịch trên cơ thể bởi CTLA4,

tác nhân hoạt hóa lympho bào T, hoặc

tác nhân làm tăng sự biểu hiện của IL-2 trong lympho bào T.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp in vivo hoặc in vitro bao gồm bước sử dụng cho tế bào lượng hữu hiệu của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế, trong đó phương pháp này được chọn từ các phương pháp sau:

phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc mức CTL4 trong mẫu,

phương pháp phong bế sự liên kết của CTLA4 với B7,

phương pháp điều hòa (ví dụ, điều hòa giảm) hoạt tính của CTLA4 hoặc mức CTLA4,

phương pháp làm thuyên giảm sự ức chế miễn dịch trên cơ thể bởi CTLA4,

phương pháp hoạt hóa lympho bào T, hoặc

phương pháp làm tăng sự biểu hiện của IL-2 trong lympho bào T.

Các phương pháp này có thể được sử dụng cho mục đích chẩn đoán hoặc trị liệu, hoặc mục đích không phải để chẩn đoán hoặc không phải để trị liệu (ví dụ, trong đó mẫu này là mẫu tế bào, hơn là mẫu từ bệnh nhân).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa và/hoặc trị liệu và/hoặc trị liệu hỗ trợ và/hoặc chẩn đoán khối u, bao gồm cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế; cụ thể, khối u được chọn từ u hắc sắc

tổ, khối u thận/khối u thuộc thận, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư bàng quang, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư dạ dày-ruột non, và ung thư gan/ung thư thuộc gan.

Theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, các quy trình nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, hóa học axit nucleic, miễn dịch học được sử dụng trong bản mô tả này là các phương pháp đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan. Trong khi đó, để hiểu sáng chế một cách rõ hơn, các định nghĩa và giải thích về các thuật ngữ có liên quan được đưa ra dưới đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, khi viện dẫn đến trình tự axit amin của CTLA4 protein (Kháng nguyên lympho bào T gây độc tế bào 4), nó bao gồm chiều dài đầy đủ của CTLA4 protein, hoặc mảnh ngoại bào của CTLA4, CTLA4ECD (SEQ ID NO: 2), hoặc mảnh chứa CTLA4ECD; nó cũng bao gồm protein dung hợp của CTLA4ECD, ví dụ, mảnh được dung hợp với mảnh protein Fc của IgG của chuột (mFc) (SEQ ID NO: 3). Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, đột biến hoặc biến đổi (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thay thế, làm khuyết và/hoặc bổ sung) có thể được tạo ra một cách tự nhiên trong hoặc được đưa một cách nhân tạo vào trình tự axit amin của CTLA4 protein, mà không ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của chúng. Do đó, theo sáng chế, thuật ngữ “CTLA4 protein” sẽ bao gồm tất cả các trình tự như vậy, bao gồm trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 2, cũng như biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của chúng. Ngoài ra, khi viện dẫn đến mảnh trình tự của CTL4 protein, nó không chỉ bao gồm mảnh trình tự của SEQ ID NO: 2, mà còn bao gồm mảnh trình tự tương ứng của biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi được nêu cụ thể, B7 chỉ B7-1 và/hoặc B7-2; và các trình tự protein cụ thể của chúng chỉ các trình tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Có thể tham khảo các trình tự được bộc lộ trong

các tài liệu chuyên ngành đã biết trong tình trạng kỹ thuật hoặc Ngân hàng gen, ví dụ, B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941), B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ EC₅₀ chỉ nồng độ cho 50% hiệu quả cực đại, tức là, nồng độ tạo ra 50% hiệu quả cực đại.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể” chỉ phân tử globulin miễn dịch nhìn chung gồm hai cặp chuỗi polypeptit (mỗi cặp có chuỗi “nhẹ” (L) và chuỗi “nặng” (H)). Chuỗi nhẹ kháng thể có thể được phân loại là chuỗi nhẹ κ và λ . Chuỗi nặng có thể được phân loại là μ , δ , γ , α hoặc ϵ , và các isotyp của kháng thể được định nghĩa là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, một cách tương ứng. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng không đổi được liên kết thông qua vùng “J” gồm khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, và chuỗi nặng còn chứa vùng “D” gồm khoảng 3 axit amin hoặc nhiều hơn. Mỗi chuỗi nặng gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng không đổi chuỗi nặng (C_H). Vùng không đổi chuỗi nặng gồm 3 miền (C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) và vùng không đổi chuỗi nhẹ (C_L). Vùng không đổi chuỗi nhẹ gồm miền C_L. Vùng không đổi của kháng thể có thể điều tiết sự liên kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ thống miễn dịch (ví dụ, các tế bào hiệu ứng) và thành phần thứ nhất của hệ thống bổ thể cổ điển (C1q). Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng có tính biến đổi cao (được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (CDR)), đặt rải rác với các vùng được gọi là vùng khung (FR) tương đối được bảo toàn. Mỗi V_H hoặc V_L gồm 3 CDR và 4 FR, được sắp xếp theo thứ tự sau từ đầu tận amino đến đầu tận carboxy: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi (V_H và V_L) của mỗi cặp của chuỗi nặng / chuỗi nhẹ tạo thành vị trí liên kết kháng thể, một cách tương ứng. Việc gán axit amin cho mỗi vùng hoặc miền tuân theo định nghĩa được đưa ra trong ấn phẩm: Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883. Thuật ngữ “kháng thể” không bị giới hạn bởi phương pháp cụ

thể bất kỳ để sản xuất kháng thể này. Ví dụ, nó bao gồm, cụ thể, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng. Kháng thể có thể là kháng thể của các isotyp khác nhau, ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể chỉ polypeptit chứa mảnh của kháng thể chiều dài đầy đủ, giữ được khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể chiều dài đầy đủ này, và/hoặc cạnh tranh với kháng thể chiều dài đầy đủ để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Nó còn được gọi là “phần liên kết kháng nguyên”. Nhìn chung, xem ấn phẩm: *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., Second Edition, Raven Press, N.Y. (1989)), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được sản xuất bởi kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc sự phân cắt bằng enzym hoặc hóa học của kháng thể nguyên vẹn. Trong một số trường hợp, mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb và mảnh vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR), kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv), kháng thể khảm, kháng thể thể đôi và các polypeptit như vậy chứa ít nhất một phần của kháng thể đủ để tạo ra khả năng liên kết kháng nguyên đặc hiệu cho polypeptit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh Fd” chỉ mảnh kháng thể gồm miền V_H và C_{H1}; thuật ngữ “mảnh Fv” chỉ mảnh kháng thể gồm miền V_L và V_H của nhánh đơn của kháng thể; thuật ngữ “mảnh dAb” chỉ mảnh kháng thể gồm miền V_H (Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989)); thuật ngữ “mảnh Fab” chỉ mảnh kháng thể gồm miền V_L, V_H, C_L và C_{H1}; và thuật ngữ “mảnh (ab')₂” chỉ mảnh kháng thể chứa hai mảnh Fab được liên kết bởi các cầu disulfua trên vùng bản lề.

Trong một số trường hợp, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể là kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv), trong đó miền V_L và V_H bắt cặp với nhau thông qua liên kết mà có khả năng sản xuất chuỗi polypeptit đơn để tạo thành phân tử đơn hóa trị (xem, ví dụ, Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988) và

Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)). Phân tử scFv như vậy có thể có cấu trúc chung: NH₂-V_L-Liên kết-V_H-COOH hoặc NH₂-V_H-Liên kết-V_L-COOH. Các liên kết thích hợp đã biết trong tình trạng kỹ thuật gồm trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc các biến thể của chúng. Ví dụ, có thể sử dụng liên kết có trình tự axit amin (GGGGS)₄, nhưng cũng có thể sử dụng các biến thể của chúng (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Các liên kết khác hữu dụng theo sáng chế được mô tả trong ấn phẩm: Alfthan et al. (1995) Protein Eng. 8: 725-731; Choi et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31: 94-106; Hu et al. (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061; Kipriyanov et al. (1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56 và Roovers et al. (2001) Cancer Immunol.

Trong một số trường hợp, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể là kháng thể thể đôi (kháng thể hóa trị hai), trong đó miền V_H và V_L được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn. Tuy nhiên, liên kết được khai thác là quá ngắn nên hai miền trên cùng chuỗi không thể bắt cặp với nhau, và được bắt cặp cưỡng bức với miền bổ sung trên chuỗi kia. Bằng cách này, hai vị trí liên kết kháng nguyên được tạo thành (xem, ví dụ, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) và Poljak R. J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể (ví dụ, các mảnh kháng thể trên đây) có thể thu được từ kháng thể đã cho (ví dụ, kháng thể đơn dòng 4B3, 13A10, 12B9, hoặc 4H4 được đề xuất theo sáng chế) sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc phương pháp phân cắt bằng enzym hoặc hóa học), và có thể được sàng lọc tính đặc hiệu theo cách giống như cách được thực hiện đối với kháng thể nguyên vẹn.

Trong bản mô tả này, trừ khi được nêu rõ ràng, khi viện dẫn đến thuật ngữ “kháng thể”, nó không chỉ bao gồm kháng thể nguyên vẹn, mà còn bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mAb” hoặc “kháng thể đơn dòng” chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể từ quần thể của các phân tử

kháng thể đồng nhất, tức là, các kháng thể riêng rẽ chứa quần thể này là giống nhau ngoại trừ các đột biến có trong tự nhiên có thể có. Kháng thể đơn dòng là có tính đặc hiệu cao đối với một epitop trên kháng nguyên. Trái với kháng thể đơn dòng, chế phẩm kháng thể đa dòng thường bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều hơn hai kháng thể khác nhau nhận biết các epitop khác nhau trên kháng nguyên. Kháng thể đơn dòng nhìn chung có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật tế bào lai được mô tả lần đầu tiên bởi Kohler et al. (Nature, 256: 495, 1975), hoặc có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp (xem patent Mỹ số 4,816,567, chẳng hạn).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể đơn dòng được đề cập bằng một con số là giống với kháng thể đơn dòng thu được từ tế bào lai được đề cập với cùng con số giống như vậy. Ví dụ, kháng thể đơn dòng 4B3 (hoặc 13A10, 12B9 hoặc 4H4) là giống với kháng thể thu được từ dòng tế bào lai 4B3 (hoặc 13A10, 12B9 hoặc 4H4) hoặc dòng phụ của chúng hoặc các tế bào con cháu của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể khảm” chỉ kháng thể như vậy, trong đó một phần của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể (mà có thể có nguồn gốc từ loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc lớp phụ kháng thể cụ thể), trong khi phần kia của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể khác (mà có thể có nguồn gốc từ các loài giống nhau hoặc khác nhau hoặc thuộc lớp hoặc lớp phụ kháng thể giống nhau hoặc khác nhau), với điều kiện là nó giữ được hoạt tính liên kết với kháng nguyên đích (patent Mỹ số 4,816,567 cấp cho Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể được làm giống như của người” chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể thu được sau khi thay thế tất cả hoặc một số CDR của globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) bằng các CDR của kháng thể không phải của người (kháng thể cho), trong đó kháng thể cho có thể là kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ) có tính đặc hiệu, ái lực hoặc tính phản ứng mong

muốn. Ngoài ra, một số gốc axit amin của các vùng khung (FR) của kháng thể nhận có thể được thay thế bằng các gốc axit amin tương ứng của kháng thể không phải của người hoặc các gốc axit amin của kháng thể khác để cải thiện hoặc tối ưu hóa thêm đặc tính của kháng thể. Chi tiết về các kháng thể được làm giống như của người, xem, ví dụ, Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992); và Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kháng thể trung hòa” chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể loại bỏ hoặc làm giảm một cách đáng kể tính độc hại của virus đích (ví dụ, khả năng lây nhiễm tế bào).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop” chỉ phần trên kháng nguyên được liên kết đặc hiệu bởi globulin miễn dịch hoặc kháng thể. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, “epitop” còn được gọi là “quyết định kháng nguyên”. Epitop hoặc quyết định kháng nguyên nhìn chung gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của phân tử, ví dụ, axit amin hoặc các hợp chất hydrat cacbon hoặc các chuỗi bên của đường, và nhìn chung có đặc tính cấu trúc không gian ba chiều đặc trưng và đặc tính tích điện đặc trưng. Ví dụ, epitop nhìn chung chứa ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp trong cấu hình không gian riêng biệt. Nó có thể là epitop “tuyến tính” hoặc “cấu hình”. Xem, ví dụ, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). Trong epitop tuyến tính, tất cả các điểm tương tác giữa protein và phân tử tương tác (ví dụ, kháng thể) có mặt dọc theo trình tự axit amin sơ cấp của protein theo đường thẳng. Trong epitop cấu hình, các điểm tương tác này có mặt dưới dạng mở rộng các gốc axit amin của protein mà riêng rẽ với nhau.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được phân lập” nghĩa là thu được từ trạng thái tự nhiên bằng các biện pháp nhân tạo. Nếu chất hoặc thành phần “được phân lập” xuất hiện trong tự nhiên, dường như là môi trường tự nhiên của nó đã thay đổi, hoặc chất này đã được phân lập từ môi trường tự nhiên, hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit không được

phân lập xuất hiện trong tự nhiên trong động vật sống in vivo, và các polynucleotit hoặc polypeptit đồng nhất có độ tinh khiết cao được phân lập từ trạng thái tự nhiên như vậy được mô tả là “được phân lập”. Thuật ngữ “được phân lập” không loại trừ hỗn hợp với các chất nhân tạo hoặc tổng hợp, và không loại trừ sự có mặt của các tạp chất khác không ảnh hưởng đến hoạt tính của chất.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hệ biểu hiện E. coli” chỉ hệ biểu hiện gồm E. coli (chủng) và vectơ, trong đó E. coli (chủng) có nguồn gốc từ các chủng có sẵn trên thị trường, ví dụ, nhưng không giới hạn ở GI698, ER2566, BL21(DE3), B834(DE3), và BLR(DE3).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vectơ” chỉ công cụ mang axit nucleic mà polynucleotit có thể được cài xen vào đó. Khi vectơ có thể biểu hiện protein được mã hóa bởi polynucleotit đã được cài xen, vectơ này được gọi là vectơ biểu hiện. Vectơ có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nhiễm, sao cho thành phần vật chất di truyền mang bởi vectơ này được biểu hiện trong tế bào chủ. Các vectơ đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: plasmit; phagemit; cosmit; nhiễm sắc thể nhân tạo, ví dụ, nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC) hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc từ P1 (PAC); thể thực khuẩn, ví dụ, thể thực khuẩn λ hoặc thể thực khuẩn M13 cũng như virus động vật, và các vectơ tương tự. Các virus động vật mà có thể được sử dụng làm vectơ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, retrovirus (bao gồm lentivirus), adenovirus, virus liên quan đến adeno, virus herpes (ví dụ, virus herpes simplex), virus gây bệnh đậu mùa, baculovirus, virus u nhú, virus papova (ví dụ, SV40). Vectơ có thể chứa một số thành phần để kiểm soát sự biểu hiện, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự gen khởi đầu, trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự tăng cường, thành phần chọn lọc và gen chỉ thị. Ngoài ra, vectơ cũng có thể chứa vị trí khởi đầu sao chép.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” chỉ tế bào có thể được sử dụng để đưa vector vào, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào sinh vật không có nhân điển hình như *E. coli* hoặc *Bacillus subtilis*, tế bào nấm như tế bào nấm men hoặc *Aspergillus*, tế bào côn trùng như tế bào ruồi giấm S2 *Drosophila* hoặc Sf9, hoặc tế bào động vật như nguyên bào sợi, tế bào CHO, tế bào COS, tế bào NSO, tế bào HeLa, tế bào BHK, tế bào HEK 293 hoặc tế bào người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “độ đồng nhất” được sử dụng để mô tả sự phù hợp trình tự giữa hai polypeptit hoặc giữa hai axit nucleic. Khi vị trí tương ứng trong hai trình tự được so sánh được choán bởi cùng cấu trúc siêu phân tử axit amin hoặc bazơ (ví dụ, các vị trí tương ứng trong hai phân tử ADN cả hai đều được choán bởi adenin, hoặc các vị trí tương ứng trong hai polypeptit cả hai đều được choán bởi lysin), thì các phân tử này là đồng nhất ở vị trí đó. “Phần trăm độ đồng nhất” giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí phù hợp có chung bởi hai trình tự này chia cho số lượng vị trí được so sánh $\times 100$. Ví dụ, nếu 6 trong số 10 vị trí của hai trình tự phù hợp, hai trình tự này có độ đồng nhất 60%. Ví dụ, trình tự ADN CTGACT và CAGGTT có chung độ đồng nhất 50% (tổng cộng 3 trong số 6 vị trí phù hợp). Nhìn chung, hai trình tự được so sánh sau khi sắp hàng để tạo ra độ đồng nhất tối đa. Ví dụ, sự sắp hàng như vậy có thể đạt được một cách thuận tiện bằng cách sử dụng chương trình máy tính, ví dụ, chương trình sắp hàng Align (DNASTAR, Inc.), bằng phương pháp của Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453. Ngoài ra, thuật toán của E. Meyers và W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)) được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0) có thể được sử dụng để xác định phần trăm độ đồng nhất giữa hai trình tự axit amin, sử dụng bảng gốc trọng số PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống bằng 12 và điểm phạt khoảng trống bằng 4. Ngoài ra, thuật toán của Needleman và Wunsch (*J Mol Biol.* 48: 444-453 (1970)) được kết hợp vào chương trình GAP của gói GCG (có sẵn ở trang web www.gcg.com) có thể được sử dụng để xác định phần trăm độ đồng nhất giữa hai trình tự axit amin, sử dụng ma trận

Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, trọng số khoảng trống bằng 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng số chiều dài bằng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự thay thế bảo toàn” chỉ sự thay thế axit amin không ảnh hưởng hoặc thay đổi một cách bất lợi các tính chất thiết yếu của protein/polypeptit chứa trình tự axit amin. Ví dụ, sự thay thế bảo toàn có thể được đưa vào bằng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như phát sinh đột biến định hướng vị trí và phát sinh đột biến được điều tiết bởi PCR. Sự thay thế axit amin bảo toàn bao gồm sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự, ví dụ, gốc tương tự với gốc axit amin tương ứng về mặt vật lý hoặc chức năng (ví dụ, có kích thước, hình dạng, điện tích, các tính chất hóa học tương tự, bao gồm khả năng tạo thành liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết hydro, hoặc các khả năng tương tự). Họ các gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này bao gồm các axit amin có mạch bên có tính bazơ (ví dụ, lysin, arginin và histidin), mạch bên có tính axit (ví dụ, axit aspartic và axit glutamic), mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, và tryptophan), mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, và methionin), mạch bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin và isoleuxin), và mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, và histidin). Do đó, ưu tiên nếu thay thế gốc axit amin tương ứng bằng gốc axit amin khác từ cùng họ mạch bên. Các phương pháp xác định sự thay thế bảo toàn axit amin là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Brummell et al., *Biochem.*, 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); và Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 412-417 (1997), các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tính sinh miễn dịch” chỉ khả năng kích thích cơ thể để tạo ra kháng thể đặc hiệu hoặc gây cảm ứng các lympho bào. Nó không chỉ chỉ tính chất của kháng nguyên mà có thể kích thích các tế bào miễn dịch đặc hiệu để kích thích sự hoạt hóa, tăng sinh và biệt

hóa của các tế bào miễn dịch, và cuối cùng là sự sản xuất các chất tác động miễn dịch như kháng thể, và có thể gây cảm ứng các lympho bào, mà còn chỉ đáp ứng miễn dịch đặc hiệu bởi hệ thống miễn dịch của cơ thể để sản xuất kháng thể hoặc gây cảm ứng các lympho bào T sau sự kích thích của cơ thể bởi kháng nguyên. Tính sinh miễn dịch là tính chất quan trọng nhất của kháng nguyên. Việc kháng nguyên có thể kích thích thành công đáp ứng miễn dịch trong vật chủ hay không tùy thuộc vào ba yếu tố: bản chất của kháng nguyên, tính phản ứng của vật chủ và cách gây miễn dịch.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” chỉ phản ứng liên kết không ngẫu nhiên giữa hai phân tử, như phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên được nhắm đích của nó. Theo một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu kháng nguyên (hoặc kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên) nghĩa là kháng thể liên kết với kháng nguyên với ái lực (K_D) ít hơn khoảng 10^{-5} M, ví dụ, ít hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc ít hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ K_D ” chỉ hằng số cân bằng phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể, được sử dụng để mô tả ái lực liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên. Hằng số cân bằng phân ly càng thấp, sự liên kết của kháng thể-kháng nguyên càng chặt chẽ và ái lực giữa kháng thể và kháng nguyên càng cao. Nhìn chung, kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng 4B3, 13A10, 12B9, hoặc 4H4 theo sáng chế) liên kết với kháng nguyên (ví dụ, L1 protein) với hằng số cân bằng phân ly (K_D) ít hơn khoảng 10^{-5} M, ví dụ, ít hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc ít hơn, ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trên thiết bị BIACORE.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” và “mAb” có cùng nghĩa, và có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Tương tự, thuật ngữ “kháng thể đa dòng” và “pAb” có cùng nghĩa, và có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Tương tự, thuật ngữ “polypeptit” và “protein” có cùng nghĩa, và có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Ngoài ra, theo sáng chế, axit

amin nhìn chung được thể hiện bằng chữ viết tắt một chữ cái hoặc ba chữ cái đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, alanin có thể được thể hiện bằng chữ cái A hoặc Ala.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào lai” và “dòng tế bào lai” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Ngoài ra, khi viện dẫn đến thuật ngữ “tế bào lai” hoặc “dòng tế bào lai”, nó cũng bao gồm các dòng phụ và các tế bào con cháu của tế bào lai. Ví dụ, khi viện dẫn đến dòng tế bào lai 4B3, nó cũng chứa các dòng phụ và các tế bào con cháu của dòng tế bào lai 4B3.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector và/hoặc tá dược được dụng” chỉ vector và/hoặc tá dược tương thích với đối tượng và thành phần hoạt tính trong dược lý học và/hoặc sinh lý học, mà đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất điều chỉnh độ pH, chất hoạt động bề mặt, chất phụ trợ, chất tăng cường mật độ ion. Ví dụ, chất điều chỉnh độ pH bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm phosphat; chất hoạt động bề mặt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất hoạt động bề mặt cation, anion hoặc không ion, ví dụ, Tween-80; và chất tăng cường mật độ ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri clorua.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất phụ trợ” chỉ chất tăng cường miễn dịch không đặc hiệu, mà có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể với kháng nguyên hoặc thay đổi loại đáp ứng miễn dịch khi được phân phối cùng với kháng nguyên hoặc được phân phối trước vào cơ thể. Có nhiều chất phụ trợ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất phụ trợ nhôm (ví dụ, nhôm hydroxit), chất phụ trợ Freund (ví dụ, chất phụ trợ Freund hoàn chỉnh và chất phụ trợ Freund không hoàn chỉnh), *Corynebacterium parvum*, lipopolysaccharit, xytokin, và các chất phụ trợ tương tự. Chất phụ trợ Freund là chất phụ trợ được sử dụng phổ biến nhất trong các thử nghiệm ở động vật hiện

nay, và nhôm hydroxit là chất phụ trợ được sử dụng rộng rãi trong các thử nghiệm lâm sàng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng đủ để đạt được hoặc ít nhất một phần đạt được tác dụng mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu để phòng ngừa bệnh (ví dụ, bệnh có liên quan đến sự liên kết quá mức của CTLA4 với B7 hoặc hoạt tính CTLA4 như khối u) chỉ lượng đủ để ngăn ngừa, làm ngừng, hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh (ví dụ, bệnh có liên quan đến sự liên kết quá mức của CTLA4 với B7 hoặc hoạt tính CTLA4 như khối u); và lượng hữu hiệu để trị liệu bệnh chỉ lượng đủ để chữa bệnh hoặc ít nhất một phần làm ngừng bệnh và các biến chứng của nó ở bệnh nhân mắc bệnh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ cách xác định lượng hữu hiệu này. Ví dụ, lượng hữu hiệu để trị liệu sẽ tùy thuộc vào mức độ trầm trọng của bệnh cần được điều trị, tình trạng chung của hệ thống miễn dịch của bệnh nhân, tình trạng chung của bệnh nhân, ví dụ, độ tuổi, thể trọng và giới tính, cách thức sử dụng chất, các trị liệu khác được sử dụng đồng thời, và các yếu tố tương tự.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Kháng thể đơn dòng 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với CTLA4 rất hiệu quả. Trong số này, kháng thể 8D2 và 8D2(Re) liên kết với kháng nguyên CTLA4 của chuột với hiệu quả liên kết tốt hơn so với kháng thể đối chứng 10D1 (Alan J. Korman, Edward L. Halk, et al., HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, patent Mỹ số US 6984720 B1) và 11.2.1 (Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveu, et al., Human monoclonal antibodies to CTLA-4, patent Mỹ số US 682736 B1). Kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của chuột với hiệu quả liên kết tốt hơn so với kháng thể đối chứng 10D1, và tương đương với 11.2.1. Kháng thể được làm giống như của người 8D2H2L2 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của người với hiệu quả liên kết tương đương với 10D1. Các kháng thể được làm giống như của người 8D2H2L2 và 8D2H3L3 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của khỉ với hiệu quả

liên kết tương đương với 10D1. Kháng thể 8D2H2L15 và 8D2H2L17 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của người với hiệu quả liên kết tốt hơn so với kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1.

Kháng thể 8D2, 8D2(Re), và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 có thể cạnh tranh với B7 để liên kết với kháng nguyên CTLA4. Trong số này, 8D2, 8D2(Re), 8D2H1L1, và 8D2H2L2 mạnh hơn so với 10D1 trong việc cạnh tranh với B7-2 để liên kết với CTLA4; và tất cả 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 đều mạnh hơn so với kháng thể 10D1 và 11.2.1 trong việc cạnh tranh với B7-1 và B7-2 để liên kết với CTLA4.

Kháng thể đơn dòng 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng theo sáng chế có thể phong bế sự liên kết của CTLA4 với B7, cụ thể làm thuyên giảm sự ức chế miễn dịch trên cơ thể bởi CTLA4, và hoạt hóa lympho bào T một cách rất hiệu quả. Trong số này, 8D2H2L2 và 8D2H2L15 mạnh hơn so với kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1 trong việc hoạt hóa lympho bào T.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Kết quả SDS-PAGE của protein dung hợp CTLA4ECD-mFc. Các mẫu và lượng nạp của chúng trong 4 làn, từ trái qua phải, là: M, Chất đánh dấu, 10 μ L; protein dung hợp CTLA4ECD-mFc, 1 μ g; protein dung hợp CTLA4ECD-mFc, 2 μ g; protein dung hợp CTLA4ECD-mFc, 3 μ g.

Fig. 2. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể 8D2. Các mẫu và lượng nạp của chúng trong 4 làn, từ trái qua phải, là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 0,3 μ g; đệm nạp không khử để điện di protein, 2 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 0,3 μ g.

Fig. 3. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể tái tổ hợp 8D2 (8D2(Re)). Các mẫu và lượng nạp của chúng trong 4 làn, từ trái qua phải, là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 1 μ g; đệm

nạp không khử để điện di protein, 2 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 1 μ g.

Fig. 4. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể được làm giống như của người của 8D2, 8D2H1L1. Các mẫu và lượng nạp của chúng trong 4 làn, từ trái qua phải, là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 1 μ g; đệm nạp không khử để điện di protein, 2 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 1 μ g.

Fig. 5. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể được làm giống như của người của 8D2, 8D2H2L2. Các mẫu và lượng nạp của chúng trong 4 làn, từ trái qua phải, là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 1 μ g; đệm nạp không khử để điện di protein, 2 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 1 μ g.

Fig. 6. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể được làm giống như của người của 8D2, 8D2H3L3. Các mẫu và lượng nạp của chúng trong 4 làn, từ trái qua phải, là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 1 μ g; đệm nạp không khử để điện di protein, 2 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 1 μ g.

Fig. 7. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể được làm giống như của người của 8D2, 8D2H2L15. Các mẫu và lượng nạp của chúng là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 1 μ g; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 1 μ g.

Fig. 8. Kết quả SDS-PAGE của kháng thể được làm giống như của người của 8D2, 8D2H2L17. Các mẫu và lượng nạp của chúng là: M, chất đánh dấu, 10 μ L; mẫu kháng thể trong đệm nạp không khử để điện di protein, 1 μ g; mẫu kháng thể trong đệm nạp khử để điện di protein, 1 μ g.

Fig. 9. Kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học của mAb 8D2.

Fig. 10. Kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học của 8D2H1L1.

Fig. 11. Kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học của 8D2H2L2.

Fig. 12. Kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học của 8D2H3L3.

Fig. 13. Kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học của 8D2H2L15.

Fig. 14. Kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học của 8D2H2L17.

Fig. 15. Biểu đồ thể hiện sự biểu hiện của CTLA4 trên tế bào 293F không được gắn nhãn, đối chứng isotyp, và tế bào 293F-CTLA4 như được phát hiện sử dụng bào kế chảy (số lượng tế bào - huỳnh quang (FITC)).

Fig. 16. Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của sự biểu hiện của CTLA4 trên tế bào 293F không được gắn nhãn, đối chứng isotyp, và tế bào 293F-CTLA4 như được phát hiện bằng cách sử dụng bào kế chảy.

Fig. 17. Kết quả EC_{50} của sự liên kết của mAb 8D2 với tế bào 293F-CTLA4 đã được gắn nhãn.

Fig. 18. Kết quả EC_{50} của sự liên kết của kháng thể 8D2(Re) với tế bào 293F-CTLA4 đã được gắn nhãn.

Fig. 19. Kết quả EC_{50} của sự liên kết của 8D2H1L1 với tế bào 293F-CTLA4 đã được gắn nhãn.

Fig. 20. Kết quả EC_{50} của sự liên kết của 8D2H2L2 với tế bào 293F-CTLA4 đã được gắn nhãn.

Fig. 21. Kết quả EC_{50} của sự liên kết của 8D2H3L3 với tế bào 293F-CTLA4 đã được gắn nhãn.

Fig. 22. Xác định sự liên kết của kháng thể 8D2, 8D2H1L1 và 8D2(Re) với CTLA4 sử dụng phương pháp ELISA.

Fig. 23. Xác định sự liên kết của kháng thể tái tổ hợp 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với CTLA4 của người sử dụng phương pháp ELISA.

Fig. 24. Xác định sự liên kết của kháng thể tái tổ hợp 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với CTLA4 của khi sử dụng phương pháp ELISA.

Fig. 25. Xác định sự liên kết của kháng thể tái tổ hợp 8D2H2L15 và 8D2H2L17 với CTLA4 của khi sử dụng phương pháp ELISA.

Fig. 26. Kết quả ELISA về sự cạnh tranh của kháng thể 8D2, 8D2H1L1 và 8D2(Re) với B7-1.

Fig. 27. Kết quả ELISA về sự cạnh tranh của kháng thể 8D2, 8D2H1L1 và 8D2(Re) với B7-2.

Fig. 28. Kết quả ELISA về sự cạnh tranh của kháng thể 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với B7-1.

Fig. 29. Kết quả ELISA về sự cạnh tranh của kháng thể 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với B7-2.

Fig. 30. Kết quả ELISA về sự cạnh tranh của kháng thể 8D2H2L15 và 8D2H2L17 với B7-1.

Fig. 31. Kết quả ELISA về sự cạnh tranh của kháng thể 8D2H2L15 và 8D2H2L17 với B7-2.

Fig. 32. Ảnh hưởng đến mức tiết IL-2 bởi lympho bào T như được phát hiện bởi phương pháp ELISA sau khi đồng nuôi cấy 72 giờ với tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào Raji và các kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2 hoặc 8D2H3L3, một cách tương ứng. Các kết quả cho thấy rằng các kháng thể được làm giống như của người của mAb 8D2 làm tăng sự tiết IL-2 bởi lympho bào T bằng cách ngăn chặn thụ thể của CTLA4.

Fig. 33. Ảnh hưởng đến mức tiết IL-2 bởi lympho bào T như được phát hiện bởi phương pháp ELISA sau khi đồng nuôi cấy 72 giờ với tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào Raji và các kháng thể được làm giống như của người 8D2H2L15 hoặc 8D2H2L17, một cách tương ứng. Các kết quả cho thấy rằng các kháng thể được làm giống như của người của mAb 8D2 làm tăng sự tiết IL-2 bởi lympho bào T bằng cách ngăn chặn thụ thể của CTLA4.

Fig. 34. Đường cong sinh trưởng của khối u được cấy dưới da trong mô hình thử nghiệm hu-SCID-raji được xử lý bằng 8D2H2L2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây dựa vào các Ví dụ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các Ví dụ sau được đưa ra chỉ nhằm minh họa sáng chế. Tuy nhiên, chúng không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các ví dụ, mà các kỹ thuật hoặc các điều kiện cụ thể không được mô tả, được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật hoặc điều kiện được bộc lộ trong các tài liệu chuyên ngành trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, được viết bởi J. Sambrook et al., được dịch bởi Peitang HUANG et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Science Press) hoặc theo các hướng dẫn được cung cấp cùng với sản phẩm. Các thuốc thử và thiết bị, mà không nêu tên nhà cung cấp, là các sản phẩm thông thường có sẵn trên thị trường.

Trong các Ví dụ theo sáng chế sau đây, các con chuột BALB/C được mua từ Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

Trong các Ví dụ theo sáng chế sau đây, tế bào T được sử dụng thu được từ Akeso Biopharma Inc., Zhongshan.

Kháng thể đối chứng, 10D1, được điều chế theo patent Mỹ số 6984720 B1; và 11.2.1 theo US 6682736 B1.

Ví dụ 1. Tạo ra dòng tế bào lai CTLA4-8D2 LT001 và điều chế kháng thể đơn dòng 8D2

CTLA4 tái tổ hợp được biểu hiện trong hệ biểu hiện tế bào động vật có vú để gây miễn dịch chuột dưới dạng kháng nguyên, và tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào lách chuột với tế bào u tủy. Dòng tế bào lai (dòng tế bào lai CTLA4-8D2 LT001) thu được sau khi sàng lọc số lượng lớn mẫu. Dòng tế bào đã nêu có thể tiết kháng thể đơn dòng 8D2, mà liên kết đặc hiệu với CTLA4. Các phương pháp cụ thể được mô tả dưới đây.

1. Tổng hợp gen CTLA4ECD-mFc

Theo thiết kế (SEQ ID NO: 3), trình tự axit amin (SEQ ID NO: 2) tương ứng với mảnh ngoại bào của gen CTLA4 (Kháng nguyên lympho bào T gây độc tế bào 4, NCBI Gene ID: 1493, SEQ ID NO: 1) (CTLA4ECD) được dung hợp với mảnh protein Fc của IgG chuột (mFc), trong đó mFc chỉ mảnh protein Fc của IgG chuột với trình tự axit amin như được thể hiện bằng phần được gạch chân của SEQ ID NO: 3.

Để làm tăng hiệu quả biểu hiện của gen quan tâm trong hệ biểu hiện tế bào 293f, trình tự axit nucleic mã hóa trình tự protein SEQ ID NO: 3 được tối ưu hóa ở Genscript Co., chủ yếu tính đến các yếu tố như sự ưu tiên codon, hàm lượng GC, cấu trúc bậc hai của mARN, và trình tự lặp lại. Gen được tối ưu cuối cùng mã hóa protein dung hợp CTLA4ECD-mFc có trình tự sau (SEQ ID NO: 4), và được tổng hợp ở Genscript Co..

Trình tự của gen CTLA4ECD (375 bp):

**GCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAG
CCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCA
AAGCCACTGAGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAG
CCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATGGGGAAT
GAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGGCACCTCCAG
TGGAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGG
ACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCG
CCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTAAT
TGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGAC (SEQ ID NO: 1)**

Trình tự của protein được mã hóa bởi CTLA4ECD (125 aa):

**AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO:
2)**

Trình tự của protein dung hợp CTLA4ECD-mFc (364 aa):
trong đó phần CTLA4ECD được gạch chân bằng đường lượn sóng, và phần mFc được gạch chân bằng đường nét đậm.

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDENLYFOGPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVS
EDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHOD
WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPPEEEM
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS
YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
(SEQ ID NO: 3)

Trình tự mã hóa của gen tương ứng với protein dung hợp CTLA4ECD-mFc (1092 bp):

trong đó phần CTLA4ECD được gạch chân bằng đường lượn sóng, và phần mFc được gạch chân bằng đường nét đậm.

GCAATGCATGTCGCACAGCCTGCAGTGGTCCTGGCAAGCTC
CAGGGGAATCGCTAGCTTCGTGTGCGAATACGCTTCCCCAGGCA
AGGCAACCGAGGTCCGGGTGACAGTCCTGAGACAGGCCGACAG
CCAGGTGACAGAAGTCTGCGCCGCTACTTATATGATGGGCAACG
AGCTGACCTTTCTGGACGATAGCATTGTACCGGGACATCTAGT
GGAAACCAAGTGAATCTGACCATCCAGGGCCTGCGCGCTATGG
ACACAGGGCTGTACATTTGTAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCT
CCATACTATCTGGGAATCGGCAACGGGACCCAGATCTACGTGAT
TGATCCTGAACCATGCCCCGACTCCGATGAGAATCTGTATTTCC
AGGGACCACGAGGCCCCACAATTAAGCCATGTCCCCCTTGCAA
TGTCCTGCACCAAACCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTTCATCTT
TCCACCCAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCACTGAGCCCCA
TTGTGACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCGAGGACGATCCTGA
TGTGCAGATCAGTTGGTTCGTCAACAATGTGGAAGTCCACACAG
CTCAGACTCAGACCCATAGGGAGGATTACAATAGTACTCTGCGC
GTCGTGTCAGCACTGCCCATTACGACACCAGGACTGGATGAGCG
GCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGATCTGCCCCG
ACCTATCGAGAGAACTATTTCCAAGCCTAAAGGGTCTGTGAGGG
CCCCACAGGTGTATGTCCTGCCTCCACCCGAGGAAGAGATGACT
AAGAAACAGGTGACACTGACTTGTATGGTCACCGACTTCATGCC
CGAAGATATCTACGTGGAGTGGACTAACAATGGGAAGACCGAA
CTGAACTATAAAAATACAGAGCCTGTGCTGGACTCAGATGGAAG
CTACTTTATGTATAGCAAGCTGCGAGTGGAAGAGAAAACTGGG
TCGAGCGGAACAGCTACTCTTGTAGTGTGGTCCACGAAGGGCTG
CATAATCACACACCACTAAATCATTCTCCCGAACTCCAGGCAA
A (SEQ ID NO: 4)

2. Tạo ra plasmit pUC57simple-CTLA4ECD-mFc

Gen dung hợp CTLA4ECD-mFc đã được tổng hợp (SEQ ID NO: 4) được tách dòng vào vectơ biểu hiện pUC57simple (do Genscript Co. cung cấp) ở Genscript Co., tạo ra plasmid pUC57simple-CTLA4ECD-mFc.

3. Tạo cấu trúc plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc

Plasmid pUC57simple-CTLA4ECD-mFc được tiêu hóa bằng endonucleaza Xba I và BamH I. Mảnh gen dung hợp CTLA4ECD-mFc được thu hồi thông qua điện di và được nối vào vectơ biểu hiện pcDNA3.1 (được mua từ Invitrogen Co.). Plasmid pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc thu được được sử dụng để chuyển nhiễm các tế bào khả biến của chủng DH5a của *E. coli* (được mua từ TIANGEN Co.). Việc chuyển nhiễm và nuôi cấy được thực hiện theo hướng dẫn. Các khuẩn lạc *E. coli* dương tính đối với pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc được sàng lọc và được nhân giống theo các phương pháp thông thường. Sau đó, plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc được chiết bằng cách sử dụng kit (được mua từ Tiangen Biotech (Beijing) Co. LTD, DP103-03) theo hướng dẫn được cung cấp cùng với kit.

4. Các tế bào 293F (được mua từ Invitrogen Co.) được chuyển nhiễm với plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc bằng cách sử dụng kit chuyển nhiễm lipofectamin (được mua từ Invitrogen Co.).

5. 7 ngày sau khi chuyển nhiễm tế bào 293F với plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc, protein dung hợp CTLA4ECD-mFc được tinh chế từ chất lỏng nuôi cấy bằng ly tâm tốc độ cao, lọc chân không thông qua màng lọc xốp mịn, và sắc ký cột HiTrap protein A HP. Sau khi tinh chế, các mẫu được lấy, được bổ sung vào đệm nạp khử để điện di protein, và được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Như được thể hiện trên Fig. 1, protein quan tâm được thể hiện dưới dạng một băng ở khoảng 45 kD.

6. Tạo ra dòng tế bào lai CTLA4-8D2 LT001

Sử dụng protein dung hợp CTLA4ECD-mFc làm kháng nguyên, tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào lá lách từ các con chuột BALB/C đã được gây miễn dịch (được mua từ Guangdong Medical Laboratory Animal

Center) với tế bào u tủy chuột theo phương pháp đã được thiết lập (ví dụ, Stewart, S. J., “Monoclonal Antibody Production”, in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G. C. Howard and D. R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

CTLA4 được sử dụng làm kháng nguyên để phủ đĩa ELISA, và tế bào lai tiết kháng thể mới liên kết đặc hiệu với CTLA4 thu được bằng cách sàng lọc ELISA gián tiếp. Dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng cạnh tranh với phối tử B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941) hoặc B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942) để liên kết với CTLA4 thu được bằng cách sàng lọc ELISA cạnh tranh từ tế bào lai thu được trong sàng lọc ELISA gián tiếp. Dòng tế bào lai ổn định thu được thông qua sự pha loãng hạn chế. Dòng tế bào lai được ký hiệu là the CTLA4-8D2 dòng tế bào lai, và dòng tế bào ổn định CTLA4-8D2 thu được thông qua sự pha loãng hạn chế (còn được gọi là LT001 theo sáng chế; kháng thể đơn dòng tiết bởi nó được ký hiệu là 8D2).

7. Điều chế kháng thể 8G2

Dòng tế bào CTLA4-8D2 (LT001) theo sáng chế được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò với IgG thấp. 7 ngày sau, dịch nổi bề mặt nuôi cấy tế bào được thu gom để tinh chế kháng thể 8D2.

8. Phát hiện kháng thể 8D2 bằng SDS-PAGE

Các mẫu đã được tinh chế được bổ sung vào đệm nạp khử để điện di protein và đệm nạp không khử để điện di protein. Sau khi đun sôi, tiến hành bước phát hiện. Các kết quả cho thấy rằng protein quan tâm được thể hiện dưới dạng hai băng ở khoảng 50 kD và 25 kD đối với mẫu protein khử, hoặc dưới dạng một băng ở khoảng 150 kD đối với mẫu protein không khử (Fig. 2).

Ví dụ 2. Xác định trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2

Theo hướng dẫn của bộ kit Cultured Cell/Bacteria Total RNA Extraction Kit (Tiangen, Cat. No. DP430), mARN được chiết từ dòng tế bào lai CTLA4-8D2 (tế bào LT001) được tạo ra trong Ví dụ 1.

Theo hướng dẫn của Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System cho bộ kit RT-PCR, cADN được tổng hợp và được khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm khuếch đại PCR được cho qua ngay bước tách dòng TA, theo hướng dẫn của pEASY-T1 Cloning Kit (TransGen, Cat. No. CT101). Sản phẩm tách dòng TA được đem giải trình tự ngay, và kết quả giải trình tự được đưa ra dưới đây.

Kết quả giải trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nặng (345 bp):

**GAGGTGAACTGGACGAACTGGCGGGGGGCTGGTGCAGC
CCGGACGACCTATGAAGCTGTCATGCGTCGCCAGCGGCTTCACC
TTAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTGAGGCAGAGCCCAGAGA
AGGGGCTGGAATGGCTGGCTCAGATCCGCAACAAACCCTACAAT
TATGAGACCTACTATTCTGACAGTGTGAAGGGCCGGTTCACAAT
TTCCAGAGACGATTCTAAAAGCTCCGTCTACCTGCAGATGAACA
ATCTGAGAGGCGAAGATATGGGGATCTACTATTGCACAGCACAG
TTCGCTTATTGGGGACAGGGCACTCTGGTCACAGTCTCCGCC
(SEQ ID NO: 5)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (115 aa):

**EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDNWMNWVRQSP
EKGLEWLAQIRNKPYNYETYYSVSKGRFTISRDDSKSSVYLQMNN
LRGEDMGIYYCTAQFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 6)**

Kết quả giải trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (318 bp):

**GACATTCAGATGACACAGAGTCCTGCTTCCCTGAGTGCCTC
AGTGGGGGAGACCGTCACAATCACTTGCGGCACCTCTGAAAACA
TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGGAAGCAGGGCAAAAG
TCCCCAGCTGCTGATCTTCGGAGCAACAAACCTGGCCGACGGCA
TGAGCTCCCGGTTTAGCGGGTCCGGATCTGGCAGACAGTACAG
CCTGAAGATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCTACTTACT
ATTGCCAGAATGTCCTGAGGAGTCCCTTCACCTTTGGGTCAGGA
ACAAAGCTGGAGATC (SEQ ID NO: 7)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (106 aa):

**DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGTSENIYGGLNWWYQRKQGKS
PQLLIFGATNLADGMSSRFSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQN
VLRSPFTFGSGTKLEI (SEQ ID NO: 8)**

Ví dụ 3. Thiết kế trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 và 8D2H2L17

Dựa trên cấu trúc tinh thể không gian ba chiều của CTL4 protein (Nat. Struct. Biol. (1997) 4, p. 527) và trình tự của kháng thể 8D2 thu được trong Ví dụ 2, cấu trúc của kháng thể được tạo mô hình trên máy tính. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 và 8D2H2L17 được thiết kế dựa trên trình tự kháng thể và mô hình cấu trúc (trình tự vùng không đổi của kháng thể là từ cơ sở dữ liệu NCBI). Các trình tự vùng biến đổi được đưa ra dưới đây.

1. Trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2H1L1

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nặng (345 bp):

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
 CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
 TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTTCAGGCAGGCACCAGGAA
 AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
 CTACGAAACTTACTACAGCGACTCCGTGAAGGGGGCGGTTCACCA
 TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
 AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
 GTTTGCTTATTGGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
 (SEQ ID NO: 9)

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (115 aa):

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
 GKGLEWLAQIRNKPYNKYETYYSDSVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNS
 LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (321 bp):

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGTCCGCATC
 TGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAGAACCTCCGAGAACA
 TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGAAAGCAGGGGAAAAG
 TCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACAAACCTGGCCAGCGGA
 ATGAGCTCCAGATTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACAGATTATAC
 TCTGAAAATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCAACCTACT
 ATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCACCCTTCACCTTTGGAAGCGGC
 ACAAACTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 11)

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (107 aa):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYGGLNWKYQKQKGS
 PKLLIYGATNLAAGMSSRFRSGSGSGTDYTLKISSLHPDDVATYYCQN
 VLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)

2. Trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2 được làm giống như của người 8D2H2L2

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nặng (345 bp):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGCCTCCGTGAAGGGGGCGGTTCACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
(SEQ ID NO: 13)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
GKGLEWLAQIRNKPYNKYETYYASVKGRFTISRDDSKNSVYLMNS
LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)**

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (321 bp):

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGAGTGCCTC
AGTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAACCAGCGAGAAC
ATCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCGAAAGCCAGGCAAGA
GCCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACCAACCTGGCCTCTGGA
GTGAGCTCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACCGACTATA
CTCTGACCATTCTAGTCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAACATAC
TATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGG
CACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 15)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (107 aa):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENIYGGLNWWYQRKPGKSP
KLLIYGATNLASGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)**

3. Trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2 được làm giống như của người 8D2H3L3

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nặng (345 bp):

**GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGCCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCAC
CTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTGAGGCAGGCACCCGGG
AAGGGGCTGGAGTGGGTCGCTCAGATCCGCAACAAACCTTACA
ATTATGAGACAGAATACGCAGCCTCTGTGAAGGGGGCGGTTCAC
ATTAGTAGAGACGATAGCAAGAACAGCGCCTATCTGCAGATGAA
TAGCCTGAAGACCGAAGATACAGCCGTCTACTATTGTACAGCTC
AGTTTGCATACTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTGACCGTCAGCTCC
(SEQ ID NO: 17)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPG
KGLEWVAQIRNKPYNYETEYAASVKGRFTISRDDSKNSAYLQMNSL
KTEDTAVYYCTAQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 18)**

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (321 bp):

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCTCTGTCCGCATCT
GTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAGAACA
TCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGC
TCCCAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACCTCCCTGGCATCTGGAG
TGCCATCCCGGTTTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACCGACTATACT
CTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCTGAAGACTTCGCCACATACTA
TTGCCAGAACGTGCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGGCA
CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 19)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (107 aa):

**DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASENIYGGLNWHYQQKPGKA
PKLLIYGATSLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)**

4. Trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2 được làm giống như của người 8D2H2L15

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nặng (345 bp):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
AGGGGCGGTTACCATTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNYETYYSASVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)**

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (321 bp):

**GACATCCAGATGACTCAGTCTCCCAGCTCCCTGTCCGC
TTCTGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGCG
AGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCCC
GGGAAAAGTCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACCT
GGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGTGGATCAGGCAGCG
GGACCGACTATACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGAG
GATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGAGCCGGCA
CCCCGGATTTGGCTCAGGGACCAAACTGGAAATTAAG (SEQ
ID NO: 21)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (107 aa):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENIYGGLNWDYQRKP
GKSPKLLIYGATNLAGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSRHPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)**

5. Trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2 được làm giống như của người 8D2H2L17

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nặng (345 bp):

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA**

**AGGGGCGGTTCACCATTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNYETYYSASVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)**

Trình tự ADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (321 bp):

**GACATCCAGATGACTCAGTCACCCAGCTCCCTGAGTG
CTTCAGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGC
GAGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCC
CGGGAAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACC
TGGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGCGGCAGCGGCTCT
GGAACCGACTATACACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGA
GGATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGTCCTCTC
GACCCGGATTTGGCAGTGGGACCAAACCTGGAAATTAAG
(SEQ ID NO: 23)**

Trình tự protein được mã hóa bởi nó (107 aa):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYGGLNHWYQRKP
GKSPKLLIYGATNLAGSVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSSRPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)**

Ví dụ 4. Điều chế kháng thể 8D2 tái tổ hợp, 8D2(Re), và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người, 8D2H1L1, 8D2H2L3, 8D2H3L3, 8D2H2L15 và 8D2H2L17, và phát hiện bằng SDS-PAGE

1. Điều chế kháng thể 8D2 tái tổ hợp, 8D2(Re), và phát hiện bằng SDS-PAGE

Trình tự cADN của chuỗi nặng (trình tự vùng biến đổi của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 5) và trình tự cADN của chuỗi nhẹ (trình tự vùng biến đổi của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 7) của 8D2 được tách dòng vào vectơ pUC57simple (do Genscript Co. cung cấp), một cách tương ứng, thu được plasmid pUC57simple-8D2H và pUC57simple-8D2L.

Plasmid pUC57simple-8D2H và pUC57simple-8D2L được tiêu hóa bằng endonucleaza (Hind III và EcoR I), một cách tương ứng. Các mảnh mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được thu hồi thông qua điện di được tách dòng phụ một cách riêng rẽ vào vectơ pcDNA3.1. Các plasmid tái tổ hợp được chiết và được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào 293F. Sau 7 ngày nuôi cấy tế bào, chất lỏng nuôi cấy được đem ly tâm ở tốc độ cao, lọc chân không thông qua màng lọc xốp mịn và tinh chế trên cột HiTrap Protein A HP. Các mẫu đã được tinh chế được bổ sung vào đệm nạp khử để điện di protein và đệm nạp không khử để điện di protein. Sau khi đun sôi, tiến hành bước phát hiện bằng SDS-PAGE. Như được thể hiện trên Fig. 3, protein quan tâm được thể hiện dưới dạng hai băng ở khoảng 50 kD và 25 kD đối với mẫu protein khử, hoặc dưới dạng một băng ở khoảng 150 kD đối với mẫu protein không khử.

2. Điều chế các kháng thể 8D2 được làm giống như của người, 8D2H1L1, 8D2H2L2 và 8D2H3L3, và phát hiện bằng SDS-PAGE

Các trình tự cADN của chuỗi nặng (trình tự vùng biến đổi của chúng được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 13, một cách tương ứng) và các trình tự cADN của chuỗi nhẹ (trình tự vùng biến đổi của chúng được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, một cách tương ứng) của 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 được tách dòng vào vectơ pUC57simple (do Genscript Co. cung cấp), một cách tương ứng, tạo ra các plasmid pUC57simple-8D2H1L1, pUC57simple-8D2H2L2, pUC57simple-8D2H3L3, pUC57simple-8D2H2L15, và

pUC57simple-8D2H2L17. Chúng được tách dòng phụ một cách riêng rẽ vào vectơ pcDNA3.1 theo quy trình được mô tả trên đây đối với 8D2(Re).

Các plasmit tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào các tế bào 293F. Chất lỏng nuôi cấy của các tế bào 293F được cho qua bước phát hiện sau khi tinh chế theo quy trình được mô tả trên đây đối với 8D2(Re). Các kết quả được thể hiện trên Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, và Fig. 8. Các mẫu protein khử cho thấy các protein quan tâm dưới dạng hai băng ở khoảng 50 kD và 25 kD, và các mẫu protein không khử cho thấy protein quan tâm dưới dạng một băng ở khoảng 150 kD.

Kháng thể 8D2 tái tổ hợp, 8D2(Re), và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người, 8D2H1L1, 8D2H2L3, 8D2H3L3, 8D2H2L15 và 8D2H2L17 sử dụng trong các ví dụ sau đây được điều chế theo quy trình được mô tả trong ví dụ này.

Ví dụ 5. Xác định các thông số động lực học của kháng thể

Các thông số động lực học về sự liên kết của kháng thể 8D2 và 8D2H1L1, 8D2H2L2 và 8D2H3L3 được làm giống như của người với kháng nguyên CTLA4 (NCBI Gene ID: 1493, với trình tự axit nucleic mã hóa như được thể hiện trong SEQ ID NO: 25 và trình tự axit amin được mã hóa như được thể hiện trong SEQ ID NO: 26) được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tương tác phân tử ForteBio.

1. CTLA4-mFc protein (CTLA4-mFc được tạo ra theo phương pháp giống như phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1 để tổng hợp CTLA4ECD-mFc) được phân cắt bằng TEV proteaza, và kháng nguyên CTLA4 thu được bằng cách tinh chế trên cột.

Trình tự của gen CTLA4 (636 bp):

ATGGGCGTCCTGCTGACTCAGAGAACCCTGCTGTCCCTGGT
 GCTGGCACTGCTGTTTCCTTCAATGGCTTCAATGGCTATGCATG
 TGGCTCAGCCAGCAGTGGTCCTGGCAAGCTCCAGGGGGGATCGC
 CAGTTTCGTGTGCGAGTACGCCTCACCTGGAAAGGCTACAGAAG
 TCCGGGTGACTGTCCTGAGACAGGCTGACTCTCAGGTGACCGA
 GGTCTGCGCCGCTACATATATGATGGGCAACGAACTGACCTTTC
 TGGACGATTCCATTTGTACTGGCACCTCTAGTGGGAACCAAGTG
 AATCTGACTATCCAGGGACTGCGAGCAATGGACACCGGACTGTA
 CATTTGCAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCTCCATACTATCTGG
 GCATCGGGAATGGAACACAGATCTACGTGATTGATCCCGAACCT
 TGTCCAGACAGCGATTTCTGCTGTGGATTCTGGCAGCCGTGTC
 AAGCGGCCTGTTCTTTTATAGCTTTCTGCTGACTGCCGTCTCCCT
 GTCTAAGATGCTGAAGAAACGATCCCCCTGACCACAGGGGGTG
 GTCGTGAAAATGCCACCTACCGAGCCCGAGTGCGAAAAACAGTT
 CCAGCCATACTTTATCCCTATCAAT (SEQ ID NO: 25)

Trình tự axit amin tương ứng được mã hóa (212 aa):

MGVLLTQRTL LSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGI
 ASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFL
 DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIG
 NGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLK
 KRSPLTTGVVVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO: 26)

2. Kháng thể 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 được cố định trên bề mặt của cảm biến AR2G bằng sự liên hợp amino, và được phong bế bằng etanolamin. Sau khi cân bằng trong PBST, kháng nguyên CTLA4 được bổ sung để liên kết. CTLA4 được pha loãng 2 lần theo dãy trong PBST, và thu được các nồng độ sau: 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,38, 4,69, 0 nM. Sự phân ly xảy ra trong PBST. Các kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1,

H2L2, H3L3, H2L15, và H2L17 được phát hiện bởi phương pháp giống như 8D2, và nồng độ kháng nguyên là 180, 90, 45, 22,5, 11,25, 5,625, 2,813, 0 nM.

Các thông số động lực học của kháng thể 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 được đưa ra trong Bảng 1, và các kết quả xác định các thông số đặc trưng động lực học được thể hiện trên các Fig. 9 đến 14, một cách tương ứng.

Bảng 1. Thông số động lực học của các kháng thể 8D2, 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17

Tên kháng thể	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{on} Error	k_{dis} (1/s)	k_{dis} Error
8D2	1,66E-10	1,42E+05	1,22E+03	2,36E-05	2,09E-06
8D2H1L1	6,08E-10	3,40E+05	1,17E+04	2,07E-04	1,81E-05
8D2H2L2	9,55E-10	4,07E+05	1,59E+04	3,88E-04	1,60E-05
8D2H3L3	1,05E-09	3,12E+05	1,01E+04	3,27E-04	1,41E-05
8D2H2L15	1,02E-09	4,54E+05	8,18E+03	4,65E-04	9,50E-06
8D2H2L17	7,66E-10	4,59E+05	8,21E+03	3,52E-04	8,30E-06
10D1	1,21E-09	4,67E+05	1,15E+04	5,65E-04	1,51E-05
11.2.1	9,03E-10	3,87E+05	5,46E+03	3,49E-04	7,32E-06

K_D , hằng số ái lực; k_{on} , tốc độ kết hợp kháng nguyên – kháng thể; k_{dis} , tốc độ phân ly kháng nguyên – kháng thể; $K_D = k_{dis}/k_{on}$.

Các kết quả chứng tỏ rằng tất cả sáu kháng thể đều có ái lực tốt đối với kháng nguyên này, tương đương hoặc thậm chí tốt hơn so với kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 6. Xác định hoạt tính của kháng thể liên kết với kháng nguyên CTLA4 trên bề mặt của dòng tế bào lai bằng bào kế chảy

Trước tiên, tế bào chủ 293F biểu hiện kháng nguyên CTLA4 được tạo ra, và được gắn nhãn bằng kháng thể đơn dòng 8D2 (Ví dụ1) và 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2 và

8D2H3L3 (Ví dụ 4) được điều chế theo sáng chế, một cách tương ứng. Sau đó, khả năng của kháng thể để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên có cấu hình tự nhiên trên bề mặt của tế bào được xác nhận bằng bào kế chảy.

Các bước cụ thể được đưa ra dưới đây.

1. Tạo ra tế bào chủ 293F biểu hiện kháng nguyên CTLA4

Các tế bào 293F được chuyển nhiễm với plasmit pLenti6.3-CTLA4 đối với CTLA4 (vector pLenti6.3 được mua từ Invitrogen Co.) sử dụng kit chuyển nhiễm lipofectamin (được mua từ Invitrogen Co.). Sau khi sàng lọc, thu được quần thể dòng vô tính của các tế bào biểu hiện ổn định CTLA4 (293F-CTLA4).

2. Gắn nhãn với kháng thể và phát hiện sử dụng bào kế chảy

Tế bào chủ 293F biểu hiện kháng nguyên CTLA4 thu được bằng các bước trên đây được tiêu hóa bằng trypsin theo phương pháp thông thường, và 2×10^5 tế bào được bổ sung vào mỗi ống thu gom. Các dung dịch đã được pha loãng của kháng thể 8D2 trong PBS chứa 1% BSA được điều chế để đạt được nồng độ bằng 20 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, và 0 nM, một cách tương ứng. Sau khi ủ với tế bào 293F biểu hiện CTLA4 trên nước đá trong 2 giờ, 100 μ L kháng thể của dê kháng IgG của chuột được liên hợp FITC (1:500) được bổ sung vào mỗi ống, và các ống được ủ trên nước đá trong 1 giờ. Sau khi bổ sung 300 μ L PBS, tín hiệu huỳnh quang được phát hiện bằng cách sử dụng kênh FITC trên bào kế chảy. Các kháng thể khác được phát hiện theo cách tương tự với kháng thể 8D2.

3. Các kết quả

Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của CTLA4 trên tế bào 293F-CTLA4 được thể hiện trên Fig. 15 và Fig. 16, một cách tương ứng. Các kết quả về sự liên kết của kháng thể 8D2, 8D2(Re), và ba kháng thể được làm giống như của người với tế bào 293F được thể hiện trên các Fig. 17 đến 21, một cách tương ứng. Như được thể hiện trên các hình vẽ, kháng thể 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng có thể liên kết một cách hiệu quả với protein đích CTLA4 trên bề mặt của tế bào chủ 293F, và hiệu quả liên kết của

chúng là phụ thuộc liều lượng. Cường độ huỳnh quang ở mỗi liều lượng được đưa ra trong Bảng 2.

Hiệu quả liên kết, EC_{50} , của 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng thu được bằng đường cong mô phỏng trong phân tích định lượng huỳnh quang của kháng thể 8D2 đã được liên kết và các kháng thể được làm giống như của người của chúng, được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 2. Phân tích cường độ huỳnh quang xác định sự liên kết của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với kháng nguyên CTLA4 trên bề mặt của tế bào chủ 293F-CTLA4 bằng bào kế chảy

	8D2	8D2(Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
Nồng độ (nM)	cường độ huỳnh quang				
0,001	7,60	24,62	10,84	10,85	10,85
0,01	7,70	24,72	10,85	32,48	25,14
0,1	9,10	66,72	21,25	124,03	108,29
1	25,50	321,27	103,04	624,65	623,25
5	182,60	713,87	558,75	972,03	970,80
10	638,60	897,63	943,84	1159,24	1084,74
25	721,80	873,24	1170,64	1132,39	1091,77

Bảng 3. Hiệu quả liên kết, EC_{50} , của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với kháng nguyên CTLA4 trên bề mặt của tế bào chủ 293F-CTLA4 thu được bằng đường cong mô phỏng trong phân tích bằng bào kế chảy

	8D2	8D2(Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
EC_{50} (nM)	3,84	1,38	5,06	4,37	4,54

Các kết quả chứng tỏ rằng tất cả các kháng thể 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2 và 8D2H3L3 đều có khả năng liên kết rất mạnh với kháng nguyên CTLA4 trên bề mặt của tế bào chủ 293F-CTLA4.

Ví dụ 7. Xác định hoạt tính của kháng thể để liên kết với kháng nguyên CTLA4 bằng ELISA

Đĩa ELISA được phủ CTLA4 ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi phong bế bằng 1% BSA ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ, các kháng thể CTLA4 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17, và kháng thể đối chứng 10D1 (Alan J. Korman, Edward L. Halk, et al., HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, Patent Mỹ số US 6984720 B1) và 11.2.1 (Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveu, et al., Human monoclonal antibodies to CTLA-4, Patent Mỹ số US 682736 B1) được bổ sung cho phản ứng trong 30. Kháng thể thứ cấp được liên hợp enzym được bổ sung cho bước ủ trong 30 phút. Sau đó, độ hấp thụ ở 450 nm được xác định trên thiết bị đọc đĩa ELISA.

Kết quả phát hiện sự liên kết của kháng thể 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người của chúng với kháng nguyên CTLA4 được thể hiện trên các Fig. 22 đến 25, một cách tương ứng. Như được thể hiện trên các hình vẽ, tất cả các kháng thể 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người đều có thể liên kết một cách hiệu quả với CTLA4 protein, và hiệu quả liên kết của chúng là phụ thuộc liều lượng. Cường độ huỳnh quang ở mỗi liều lượng được đưa ra trong các Bảng 4 đến 8. Hiệu quả liên kết, EC₅₀, của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể được làm giống như của người thu được bằng đường cong mô phỏng trong phân tích định lượng huỳnh quang của 8D2, 8D2(Re) đã được liên kết và các kháng thể được làm giống như của người (Bảng 9).

Bảng 4. Sự liên kết của 8D2 và 8D2(Re) với CTLA4 của chuột (ELISA)

Nồng độ kháng thể (µg/ml)	Phủ kháng nguyên: CTLA4 của chuột ở nồng độ 0,5 µg/ml					
	8D2		8D2(Re)		10D1	
1	2,823	2,682	2,672	2,769	2,995	2,975
0,3	2,806	2,763	2,690	2,735	2,852	2,900
0,1	2,754	2,718	2,796	2,685	2,429	2,538
0,03	2,336	2,381	2,305	2,259	1,507	1,704
0,01	1,614	1,560	1,397	1,446	0,673	0,794
0,003	0,784	0,760	0,662	0,674	0,292	0,328
0,001	0,358	0,355	0,315	0,321	0,136	0,142
0	0,063	0,052	0,053	0,046	0,046	0,050

Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Dê kháng Chuột	Kháng thể thứ cấp Dê kháng Người
-------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

Bảng 5. Sự liên kết của 8D2, 8D2H1L1 và 8D2(Re) với CTLA4 của người (ELISA)

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/ml}$)	Phủ kháng nguyên: CTLA4 của người ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$									
	10D1		11.2.1		8D2H1L1		8D2		8D2(Re)	
1	3,479	3,432	3,584	3,547	3,016	3,031	3,029	3,107	3,058	3,085
1:3	3,323	3,155	3,499	3,479	2,834	2,904	3,076	3,074	2,930	3,072
1:9	2,506	2,293	3,211	3,187	2,610	2,670	2,878	2,988	2,805	2,868
1:27	1,331	1,194	2,337	2,293	1,834	1,944	2,265	2,287	2,052	2,064
1:81	0,552	0,528	1,254	1,267	0,969	0,996	1,335	1,479	1,398	1,271
1:243	0,202	0,222	0,536	0,552	0,450	0,515	0,666	0,770	0,634	0,649
1:729	0,141	0,115	0,253	0,263	0,204	0,206	0,277	0,351	0,307	0,309
0	0,090	0,086	0,072	0,064	0,067	0,067	0,064	0,067	0,071	0,086
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Dê kháng IgG Người					Kháng thể thứ cấp Dê kháng IgG Chuột				

Bảng 6. Sự liên kết của 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với CTLA4 của người (ELISA)

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/ml}$)	Phủ kháng nguyên: CTLA4 của người ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$							
	8D2H2L2		8D2H3L3		10D1		11.2.1	
1	1,489	1,411	1,631	1,601	1,775	2,069	2,206	2,150
1:3	1,178	1,262	1,192	1,455	1,527	1,480	1,825	2,047
1:9	0,710	0,872	0,943	1,007	1,073	1,204	1,292	1,409
1:27	0,336	0,370	0,642	0,658	0,663	0,585	0,893	0,682
1:81	0,192	0,195	0,415	0,374	0,349	0,323	0,499	0,426
1:243	0,097	0,109	0,230	0,214	0,132	0,146	0,223	0,219
1:729	0,075	0,083	0,100	0,130	0,099	0,099	0,127	0,136
0	0,052	0,055	0,052	0,057	0,056	0,053	0,057	0,061
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Dê kháng IgG Người được liên hợp với HRP							

Bảng 7. Sự liên kết của 8D2H2L2 và 8D2H3L3 với CTLA4 của khí (ELISA)

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/ml}$)	Phủ kháng nguyên: CTLA4 của khí-hFc ở nồng độ 0,25 $\mu\text{g/ml}$							
	8D2H2L2		8D2H3L3		10D1		11.2.1	
1	1,576	1,624	1,235	1,321	1,788	1,846	1,718	1,632
1:3	1,223	1,199	0,921	0,873	1,250	1,344	1,540	1,460
1:9	0,793	0,775	0,654	0,724	0,845	0,868	1,114	1,054
1:27	0,471	0,426	0,441	0,403	0,429	0,402	0,625	0,665
1:81	0,220	0,230	0,239	0,218	0,190	0,191	0,297	0,313
1:243	0,114	0,117	0,123	0,119	0,104	0,108	0,130	0,172
1:729	0,071	0,076	0,088	0,096	0,063	0,067	0,082	0,094
0	0,048	0,048	0,048	0,050	0,049	0,053	0,048	0,051
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Dê kháng IgG Người được liên hợp với HRP, F(ab') ₂							

Bảng 8. Sự liên kết của 8D2H2L15 và 8D2H2L17 với CTLA4 của người (ELISA)

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/ml}$)	Phủ kháng nguyên: CTLA4 ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$											
	8D2H2L2 20150327		8D2H2L15		8D2H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20140422	
1	2,34	2,37	2,58	2,55	2,61	2,81	2,56	2,74	2,75	2,69	2,23	2,40
1:3	2,22	2,09	2,65	2,72	2,73	2,78	2,42	2,44	2,56	2,66	2,09	2,07
1:9	2,03	1,87	2,79	2,45	2,59	2,73	2,20	2,20	2,69	2,44	1,92	1,95
1:27	1,82	1,93	2,43	2,21	2,41	2,28	1,81	1,70	2,13	2,28	1,47	1,63
1:81	1,10	1,17	1,95	1,83	1,80	1,68	1,03	1,09	1,37	1,53	1,10	1,01
1:243	0,65	0,58	1,05	1,02	1,14	1,19	0,51	0,53	0,75	0,79	0,49	0,50
1:729	0,26	0,21	0,53	0,44	0,57	0,50	0,21	0,24	0,32	0,31	0,23	0,20
0	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Kháng thể thứ cấp	kháng thể Dê kháng IgG Người được liên hợp với HRP (1:5000)											

Bảng 9: Hiệu quả liên kết, EC₅₀, của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 với kháng nguyên CTLA4 thu được bằng đường cong mô phỏng trong phân tích bằng ELISA

	Nguồn kháng nguyên	EC ₅₀ Kháng thể (nM)	EC ₅₀ 10D1 (nM)	EC ₅₀ 11.2.1 (nM)
--	-----------------------	------------------------------------	-------------------------------	---------------------------------

	CTLA4			
8D2	Chuột	0,015	0,062	0,023
		0,071	0,24	
8D2(Re)	Chuột	0,015	0,062	0,023
		0,085	0,24	
8D2H1L1	Chuột	0,025	0,062	0,023
8D2H2L2	Người	0,12	0,125	0,09
8D2H2L2	Người	0,082	0,125	0,09
8D2H2L2	Người	0,118	0,125	0,09
8D2H3L3	Người	0,129	0,125	0,09
8D2H2L2	Khí	0,227	0,258	0,075
8D2H3L3	Khí	0,385	0,258	0,075
8D2H2L15	Người	0,042	0,138	0,075
8D2H2L17	Người	0,047	0,138	0,075

Lưu ý: 8D2H2L2 được xác định trong ba bản sao.

Các kết quả trên đây chứng tỏ rằng kháng thể 8D2 và 8D2(Re) liên kết với kháng nguyên CTLA4 của chuột với hiệu quả tốt hơn so với hiệu quả của kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1. Kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của chuột với hiệu quả mạnh hơn so với hiệu quả của kháng thể đối chứng 10D1 và tương đương với hiệu quả của 11.2.1.

Kháng thể được làm giống như của người 8D2H2L2 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của người với hiệu quả tương đương với hiệu quả của 10D1. Các kháng thể được làm giống như của người 8D2H2L2 và 8D2H3L3 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của khí với hiệu quả tương đương với hiệu quả của 10D1. Kháng thể được làm giống như của người 8D2H2L15 và 8D2H2L17 liên kết với kháng nguyên CTLA4 của người với hiệu quả mạnh hơn một cách đáng kể so với hiệu quả của kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1.

Ví dụ 8. Phát hiện hoạt tính của kháng thể cạnh tranh với B7-1/2 để liên kết với kháng nguyên CTLA4 bằng ELISA cạnh tranh

1. Phát hiện hoạt tính của kháng thể cạnh tranh với B7-1 để liên kết với kháng nguyên CTLA4 bằng ELISA

Các đĩa ELISA được phủ B7-1 ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi phong bế bằng 1% BSA ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ, kháng thể kháng CTLA4, tức là,

kháng thể đơn dòng 8D2 và 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17, cũng như kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1 được bổ sung. Sau khi ủ trong 10 phút, CTLA4-mFc được bổ sung. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, kháng thể thứ cấp được liên hợp enzym được bổ sung. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút, độ hấp thụ ở 450 nm được phát hiện trên thiết bị đọc đĩa ELISA.

2. Phát hiện hoạt tính của kháng thể cạnh tranh với B7-2 để liên kết với kháng nguyên CTLA4 bằng ELISA

Các đĩa ELISA được phủ CTLA4-mFc ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi phong bế bằng 1% BSA ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ, kháng thể kháng CTLA4, tức là, kháng thể đơn dòng 8D2 và 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17, cũng như kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1 được bổ sung. Sau khi ủ trong 10 phút, B7-2-his được bổ sung. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, kháng thể thứ cấp được liên hợp enzym được bổ sung. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút, độ hấp thụ ở 450 nm được phát hiện trên thiết bị đọc đĩa ELISA. Kết quả phát hiện sự liên kết của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể được làm giống như của người với kháng nguyên CTLA4 được thể hiện trên các Fig. 26 đến 31, một cách tương ứng. Như được thể hiện trên các hình vẽ này, kháng thể 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người có thể liên kết một cách hiệu quả với CTLA preotein, và hiệu quả liên kết của chúng là phụ thuộc liều lượng. Cường độ huỳnh quang ở mỗi liều lượng được đưa ra trong các Bảng 10 đến 16. Hiệu quả liên kết, EC_{50} , của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể được làm giống như của người thu được bằng đường cong mô phỏng trong phân tích định lượng huỳnh quang của kháng thể 8D2, 8D2(Re) đã được liên kết và các kháng thể được làm giống như của người (Bảng 17).

Bảng 10. 8D2 và 8D2(Re) cạnh tranh với B7-1 trong ELISA

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/ml}$)	Phủ kháng nguyên: CTLA4-mFc ở nồng độ 0,2 $\mu\text{g/ml}$			
	8D2		8D2(Re)	
3	0,163	0,149	0,176	0,215
1	0,208	0,188	0,200	0,214
0,3	0,354	0,347	0,355	0,390
0,1	0,680	0,695	0,668	0,721
0,03	1,378	1,262	1,430	1,708
0,01	1,758	1,612	1,630	1,824
0,003	1,982	1,711	1,890	1,937
0	2,228	1,766	1,805	1,779
B7/1-hFc (0,3 $\mu\text{g/ml}$)				
Kháng thể thứ cấp		Kháng thể thứ cấp của Dê kháng Người		

Bảng 11. 8D2, 8D2H1L1 và 8D2(Re) cạnh tranh với B7-1 trong ELISA

Nồng độ kháng thể (µg/ml)	Phủ: B7/1-hFc ở nồng độ 0,2 µg/ml							
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		CTLA4-mFc (0,6 µg/ml) 1:2	
3	0,168	0,158	0,101	0,105	0,123	0,138	0,824	0,791
1:3	0,258	0,232	0,119	0,133	0,206	0,231	0,640	0,768
1:9	0,515	0,466	0,381	0,485	0,445	0,529	0,750	0,717
1:27	0,577	0,508	0,597	0,579	0,509	0,659	0,653	0,626
1:81	0,801	0,730	0,650	0,613	0,669	0,723	0,571	0,522
1:243	0,814	0,848	0,900	0,520	0,841	0,821	0,459	0,327
1:729	0,854	0,732	0,993	0,841	0,848	0,822	0,312	0,232
0	0,856	0,812	0,826	0,550	0,672	0,600	0,071	0,074
Kháng nguyên	CTLA4-mFc 0,3µg/ml						Đối chứng	
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp của Dê kháng IgG Chuột được liên hợp với HRP							

Bảng 12. 8D2, 8D2H1L1 và 8D2(Re) cạnh tranh với B7-2 trong ELISA

Nồng độ kháng thể $\mu\text{g/ml}$	Phủ kháng nguyên: CTLA4-mFc ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$									
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		8D2		8D2(Re)	
3	0,569	0,550	0,492	0,442	0,450	0,384	0,407	0,336	0,367	0,375
1:3	0,500	0,466	0,387	0,402	0,404	0,332	0,359	0,306	0,331	0,289
1:9	0,736	0,782	0,412	0,482	0,467	0,371	0,456	0,355	0,384	0,315
1:27	0,982	1,137	0,676	0,585	0,671	0,633	0,675	0,675	0,464	0,443
1:81	1,196	1,355	1,120	0,965	1,038	1,007	1,091	1,050	0,713	0,622
1:243	1,171	1,380	1,237	1,214	1,215	1,069	1,154	1,172	0,862	0,766

1:729	1,307	1,388	1,362	1,229	1,231	1,253	1,242	1,264	0,826	0,725
0	1,030	1,171	1,187	1,100	1,130	1,076	1,034	1,183	0,915	0,861
Thụ thể	B7/2-His ở nồng độ 1 µg/ml									
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Chuột kháng His được liên kết với HRP									

Bảng 13. Kháng thể 8D2H2L2 và 8D2H3L3 cạnh tranh với B7-1 trong ELISA

Nồng độ kháng thể (µg/ml)	Phủ: B7/1-hFc ở nồng độ 0,3 µg/ml							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
5	0,207	0,232	0,187	0,202	0,166	0,172	0,080	0,089
1:3	0,346	0,267	0,286	0,327	0,210	0,194	0,090	0,097
1:9	0,625	0,702	0,416	0,388	0,486	0,548	0,160	0,138
1:27	0,577	0,727	0,590	0,503	0,673	0,621	0,488	0,369
1:81	0,830	0,743	0,747	0,617	0,663	0,647	0,698	0,660
1:243	0,707	0,760	0,673	0,768	0,652	0,775	0,755	0,900
1:729	0,780	0,882	0,840	0,842	0,705	0,691	0,909	0,793
0	0,577	0,752	0,632	0,745	0,732	0,909	0,683	0,735
Kháng nguyên	CTLA4-mFc ở nồng độ 0,3 µg/ml							
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp của Dê kháng IgG Chuột được liên hợp với HRP							

Bảng 14. Kháng thể 8D2H2L2 và 8D2H3L3 cạnh tranh với B7-2 để liên kết với CTLA4 trong ELISA

Nồng độ kháng thể (µg/ml)	Phủ kháng nguyên: CTLA4-mFc ở nồng độ 0,5 µg/ml							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
1,5	0,377	0,376	0,417	0,432	0,449	0,408	0,372	0,494
1:3	0,616	0,537	0,540	0,511	0,553	0,602	0,437	0,348
1:9	0,988	0,927	0,548	0,614	0,806	0,788	0,479	0,412
1:27	1,085	1,038	0,717	0,728	0,969	0,890	0,622	0,529
1:81	1,227	1,059	1,010	0,951	0,974	0,916	0,805	0,649
1:243	1,136	1,066	1,255	1,160	0,935	0,921	0,930	0,754
1:729	1,218	1,158	1,239	1,162	1,108	1,045	0,981	0,746
0	1,094	1,068	1,198	1,214	1,082	1,047	0,987	0,819
Phối tử	B7/2-His ở nồng độ 1 µg/ml							
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Chuột kháng His được liên hợp với HRP							

Bảng 15. Kháng thể 8D2H2L15 và 8D2H2L17 cạnh tranh với B7-1 để liên kết với CTLA4 trong ELISA

Sự pha loãng kháng thể	Phủ kháng nguyên: B7/1-hFc ở nồng độ 0,5 µg/ml											
	8D2 H2L2 (20150327)		8D2 H2L15		8D2 H2L17		10D1		11.2.1		8D2 H2L2 (20140422)	
5 µg/ml	0,09	0,10	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,11	0,06	0,06	0,12	0,14
1:3	0,13	0,14	0,07	0,07	0,06	0,07	0,33	0,24	0,09	0,08	0,26	0,24
1:9	0,29	0,26	0,07	0,09	0,08	0,08	0,71	0,78	0,33	0,30	0,45	0,49
1:27	0,66	0,58	0,70	1,03	0,89	0,93	1,11	1,17	1,14	1,19	1,06	1,10
1:81	0,69	0,62	0,68	1,18	0,97	0,79	1,16	1,35	1,17	1,20	1,09	1,09
1:243	0,66	0,64	0,75	1,13	1,05	0,99	1,27	1,48	1,30	1,31	1,19	0,99
1:729	0,69	0,64	0,74	1,07	1,25	1,35	1,33	1,56	1,32	1,31	1,16	1,12
0	0,59	0,66	0,53	1,09	1,18	1,18	1,33	1,29	1,28	1,30	1,11	1,04
Phối tử	CTLA4-mFc ở nồng độ 0,3 µg/ml											
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Chuột kháng His được liên kết với HRP											

Bảng 16. Kháng thể 8D2H2L15 và 8D2H2L17 cạnh tranh với B7-2 để liên kết với CTLA4 trong ELISA

Sự pha loãng kháng thể	CTLA4-mFc ở nồng độ 2 µg/ml											
	8D2H2L2 20140422		8D2H2L15		8D2H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20150327	
1 µg/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05
1:3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07	0,05	0,05	0,47	0,37
1:9	0,15	0,16	0,17	0,19	0,06	0,12	0,44	0,35	0,17	0,16	0,65	0,58
1:27	0,55	0,59	0,42	0,48	0,50	0,57	0,73	0,70	0,57	0,57	0,79	0,70
1:81	0,76	0,84	0,75	0,75	0,77	0,81	0,85	0,86	0,84	0,76	0,86	0,77
1:243	0,84	0,79	0,83	0,84	0,82	0,87	0,86	0,89	0,84	0,85	0,83	0,84
1:729	0,77	0,76	0,94	1,00	0,97	0,98	0,99	0,91	0,87	0,85	0,82	0,80
0	0,77	0,78	0,92	0,97	0,81	0,82	0,76	0,96	0,91	0,80	0,80	0,76
Phối tử	B7/2-His, 0,5 µg/ml											
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể thứ cấp Chuột kháng His được liên hợp với HRP (1:4000)											

Bảng 17. Hiệu quả liên kết, EC₅₀, của 8D2, 8D2(Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 với kháng nguyên CTLA4 trong sự cạnh tranh với B7 thu được bằng đường cong mô phỏng trong phân tích bằng ELISA cạnh tranh

	EC ₅₀ Kháng thể (nM)		EC ₅₀ 10D1 (nM)		EC ₅₀ 11.2.1 (nM)	
	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2
8D2	0,44	0,208	—	0,464	—	0,15
8D2(Re)	0,514	0,153	—	0,464	—	0,15
8D2H1L1	2,478	0,178	1,91	0,464	1,691	0,15
8D2H2L2	5,932	1,643	5,15	2,056	1,073	0,172
8D2H2L2	2,973	0,368	—	—	—	—
8D2H2L2	3,118	0,301	—	—	—	—
8D2H3L3	2,144	0,167	5,15	2,056	1,073	0,172
8D2H2L15	1,973	0,227	4,586	0,629	2,606	0,349
8D2H2L17	1,787	0,296	4,586	0,629	2,606	0,349

Lưu ý: 8D2H2L2 được thử nghiệm trong ba bản sao.

Các kết quả trên đây chứng tỏ rằng tất cả các kháng thể 8D2, 8D2 (Re) và các kháng thể 8D2 được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 đều có thể cạnh tranh với B7 để liên kết với kháng nguyên CTLA4. Cụ thể, 8D2, 8D2(Re), 8D2H1L1, và 8D2H2L2 mạnh hơn 10D1 trong sự cạnh tranh với B7-2 để liên kết với CTLA4, trong khi 8D2H2L17 mạnh hơn kháng thể 10D1 và 11.2.1 trong sự cạnh tranh với cả B7-1 và B7-2 để liên kết với CTLA4.

Ví dụ 9. Phân tích hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 trong các tế bào

Để phát hiện ảnh hưởng của kháng thể đơn dòng 8D2 và các kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17, và kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1 đến sự biểu hiện IL-2 của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), máu ngoại vi từ các thể cho khỏe mạnh được thu gom vào ống thu gom chứa heparin natri. PBMC thu được dưới dạng huyền phù tế bào sau khi pha loãng trong PBS và ly tâm trên môi trường phân tách (ở tốc độ 2550 vòng/phút trong 20 phút). Huyền phù tế bào được bổ sung SEB (1 µg/mL) / PHA (30 µl/ml) và được đặt trong thiết bị ủ ở nhiệt độ 37°C với độ ẩm bão hòa chứa 5% CO₂ để nuôi cấy tiếp. Lympho bào Raji và kháng thể được bổ sung. Sau khi ủ đồng thời trong 48 giờ, PBMC được rửa bằng PBS hai lần, và được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ ở mật độ 10.000 tế

bào/lỗ. Sau đó, gradien nồng độ tương ứng của kháng thể được bổ sung. Sau khi ủ trong 20 phút, các tế bào Raji đã được xử lý bằng MMC trong 1 giờ được bổ sung ở mật độ 10.000 tế bào/lỗ để đồng nuôi cấy trong 72 giờ. Sau khi đồng nuôi cấy trong 72 giờ, môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom dịch nổi bề mặt và protein biểu hiện IL-2 trong dịch nổi bề mặt của môi trường đồng nuôi cấy tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng bộ kit ELISA theo hướng dẫn được cung cấp cùng với bộ kit này (Dakewe Co., DKW12-1020-096).

Sau khi phân tích thống kê, kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên các Fig. 32 và 33. So với nhóm tế bào T và nhóm tế bào Raji, đối với kháng thể đơn dòng 8D2, tất cả các kháng thể được làm giống như của người 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, và 8D2H2L17 của chúng có thể phong bế một cách hiệu quả sự liên kết của CTLA4 với B7 và cải thiện sự biểu hiện của IL-2 trong lympho bào T (Fig. 32 và 33). Cụ thể, tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng 8D2H2L2, 8D2H2L15 và 8D2H2L17 tốt hơn một cách đáng kể so với kháng thể đối chứng 10D1 và 11.2.1. Ở nồng độ 10 nM, chúng đạt được mức IL-2 tương đương hoặc thậm chí tốt hơn so với mức đạt được bởi 10D1 hoặc 11.2.1 ở nồng độ bằng 100 nM. Do đó, kháng thể theo sáng chế có thể làm tăng mức IL-2 ở nồng độ thấp hơn, ví dụ, khoảng 10 nM.

Ví dụ 10. Hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể đơn dòng 8D2H2L2

Hoạt tính kháng khối u *in vivo* của 8D2H2L2 được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình thử nghiệm động vật hu-SCID-raji. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC) được phân lập bằng cách sử dụng thuốc thử Ficoll, và được hoạt hóa bằng cách sử dụng SEB ở nồng độ 1 µg/ml trong 3 ngày. Sau đó, $1,25 \times 10^6$ PBMC đã được hoạt hóa được trộn với 5×10^6 tế bào u lympho raji Burkitt và 8D2H2L2 (20 mg/kg), và được tiêm dưới da trên lưng của chuột SCID-màu be. Đồng thời, nhóm đối chứng isotyp được thiết lập, 5 động vật cho mỗi nhóm. Tiếp theo, liều 20 mg/kg được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch một tuần một lần trong ba tuần liên tiếp. Thử nghiệm khối u được xác

định hai lần một tuần cho đến khi kết thúc thử nghiệm hoặc khi thể tích khối u đạt đến 1000 mm³.

Như được thể hiện trên Fig. 34, 8D2H2L2 có thể ức chế một cách đáng kể sự phát triển khối u trong mô hình thử nghiệm hu-SCID-raji. Kết quả này chỉ ra rằng kháng thể này có thể được sử dụng về mặt lâm sàng để điều trị u lympho.

Mặc dù các phương án cụ thể theo sáng chế đã được mô tả chi tiết, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, khi xem xét phần chỉ dẫn được bộc lộ trong bản mô tả này, sẽ hiểu rằng các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được thực hiện đối với các chi tiết này, tất cả các thay đổi và cải biến này đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Phạm vi đầy đủ của sáng chế được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và các dạng tương đương bất kỳ của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với CTLA4 của người, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27,

HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, và

HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 29; và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

LCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 30,

LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, và

LCDR3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, và SEQ ID NO:34.

2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:27, HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:28, và HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:30, LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:31, và LCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:32;

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:27, HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:28, và HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:30, LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:31, và LCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:33; và

(c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:27, HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:28, và HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1

chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:30, LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:31, và LCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:34.

3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm 2, chứa: vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:27, HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:28, và HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:30, LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:31, và LCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:32.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, và bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 10, trong đó methionin ở vị trí 18 của SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6, and SEQ ID NO: 10 được thay thế bằng axit amin được chọn từ leuxin, valin, isoleuxin, hoặc alanin, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:8, và SEQ ID NO:12.

5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 6 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:8;

(b) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:12;

(c) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:16;

(d) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:20;

(e) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi

chuỗi nặng SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:22;

(f) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:24;

(g) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 6, trong đó methionin ở vị trí 18 được thay thế bằng leuxin, valin, isoleuxin hoặc alanin, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 8;

(h) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 10, trong đó methionin ở vị trí 18 được thay thế bằng leuxin, valin, isoleuxin hoặc alanin, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 12;

(i) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 14, trong đó methionin ở vị trí 18 được thay thế bằng leuxin, valin, isoleuxin hoặc alanin, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 16;

(j) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 14, trong đó methionin ở vị trí 18 được thay thế bằng leuxin, valin, isoleuxin hoặc alanin, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 22; và

(k) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 14, trong đó methionin ở vị trí 18 được thay thế bằng leuxin, valin, isoleuxin hoặc alanin, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 24.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm 4 hoặc điểm 5, trong đó methionin ở vị trí 18 của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 14 được thay thế bằng leuxin.

7. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với CTLA4 của người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO:14, trong đó methionin ở vị trí 18 của SEQ ID NO: 14 được thay thế bằng leuxin và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:16.

8. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này là kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết

kháng nguyên của chúng.

9. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với CLTA4 của người với K_D ít hơn khoảng 10^{-5} M, như được xác định bởi cộng hưởng plasmon bề mặt.

10. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng:

- (a) phong bế sự liên kết của CTLA4 của người với B7 của người;
- (b) điều hòa hoạt tính của CTLA4 của người;
- (c) làm thuyên giảm sự ức chế miễn dịch trên cơ thể bởi CTLA4;
- (d) hoạt hóa lympho bào T, và/hoặc
- (e) làm tăng sự biểu hiện của IL-2 trong lympho bào T.

11. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, hoặc SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, và SEQ ID NO: 14 trong đó methionin ở vị trí 18 của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, và SEQ ID NO: 14 được thay thế bằng leuxin, valin, isoleuxin, hoặc alanin; hoặc

(b) phân tử axit nucleic được phân lập chứa trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, hoặc SEQ ID NO: 17.

12. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 24; hoặc

(b) phân tử axit nucleic được phân lập chứa trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 hoặc SEQ ID NO: 23.

13. Vector chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 11 và/hoặc điểm 12.

14. Tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 11 và/hoặc điểm 12, hoặc vector theo điểm 13.

15. Phương pháp điều chế kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 14 trong các điều kiện thích hợp và thu hồi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng từ môi trường nuôi cấy tế bào.

16. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và chất mang và/hoặc tá dược được dụng.

17. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với CTLA4 của người, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

HCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27,

HCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, và

HCDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 29; và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

LCDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 30,

LCDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, và

LCDR3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, và SEQ ID NO: 34,

để sử dụng trong sản xuất thuốc để điều trị khối u.

1/15

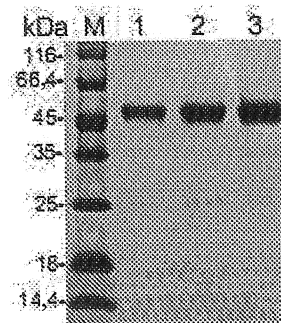


Fig. 1

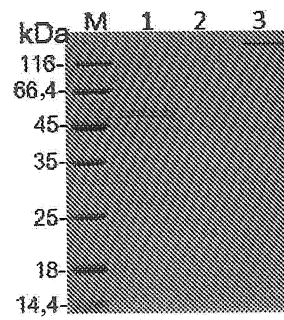


Fig. 2

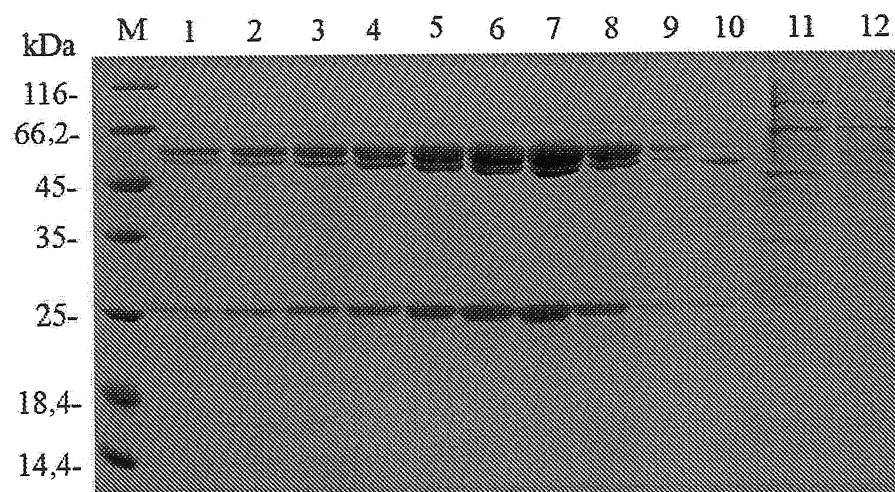


Fig. 3

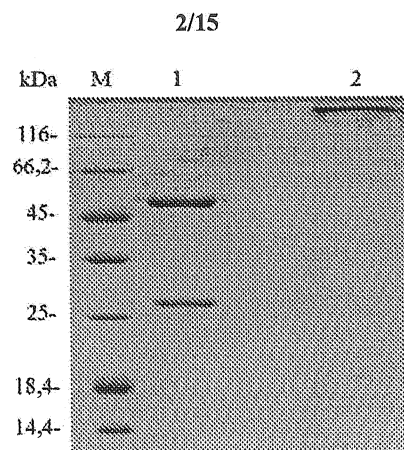


Fig. 4

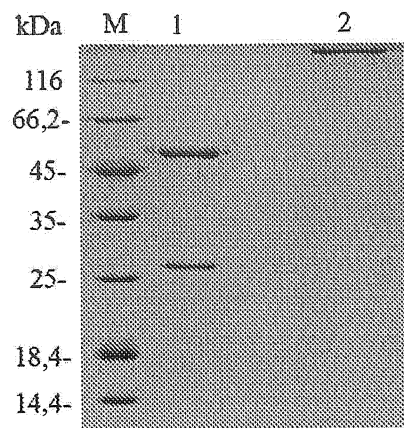


Fig. 5

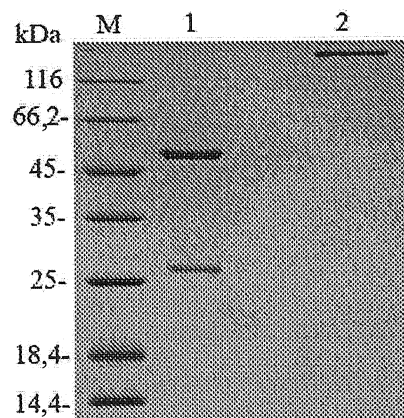


Fig. 6

3/15

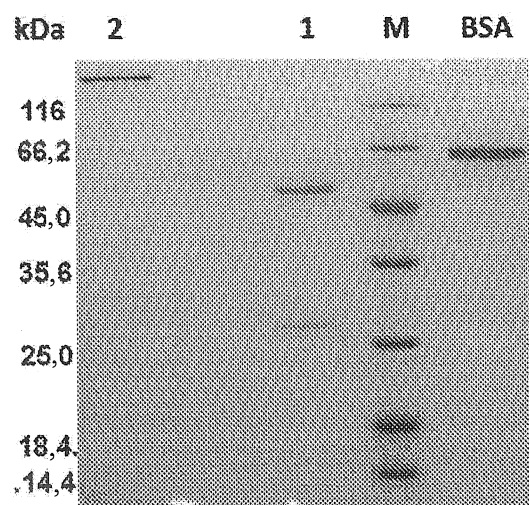


Fig. 7

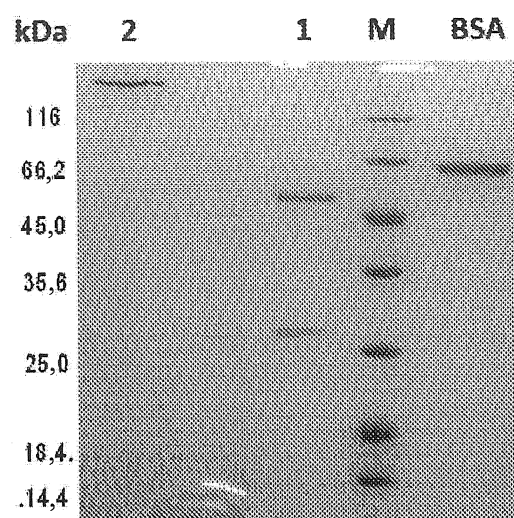


Fig. 8

4/15

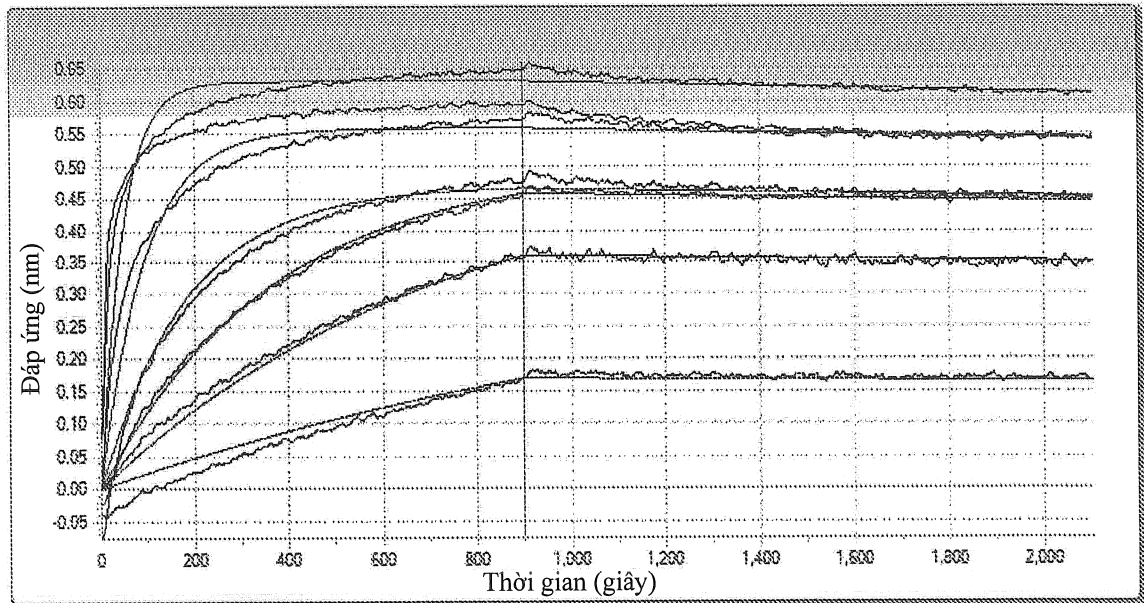


Fig. 9

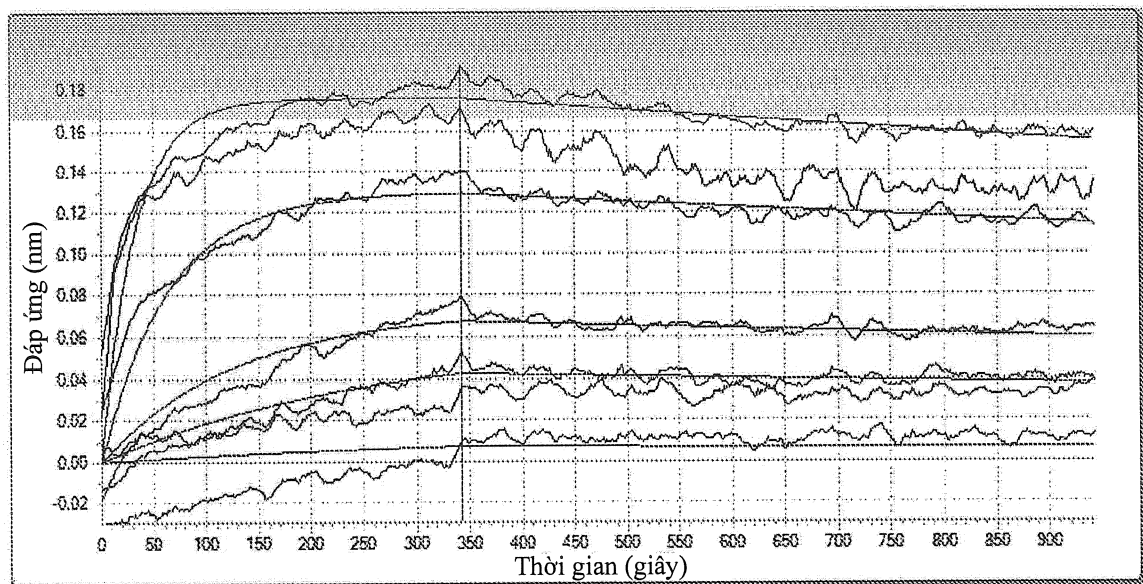


Fig. 10

5/15

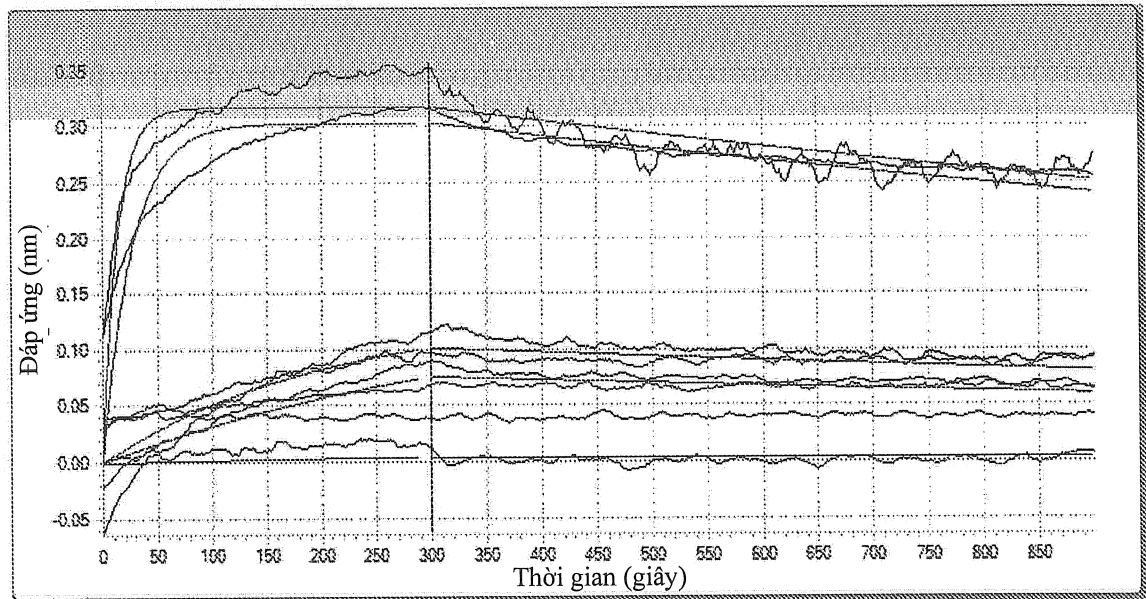


Fig. 11

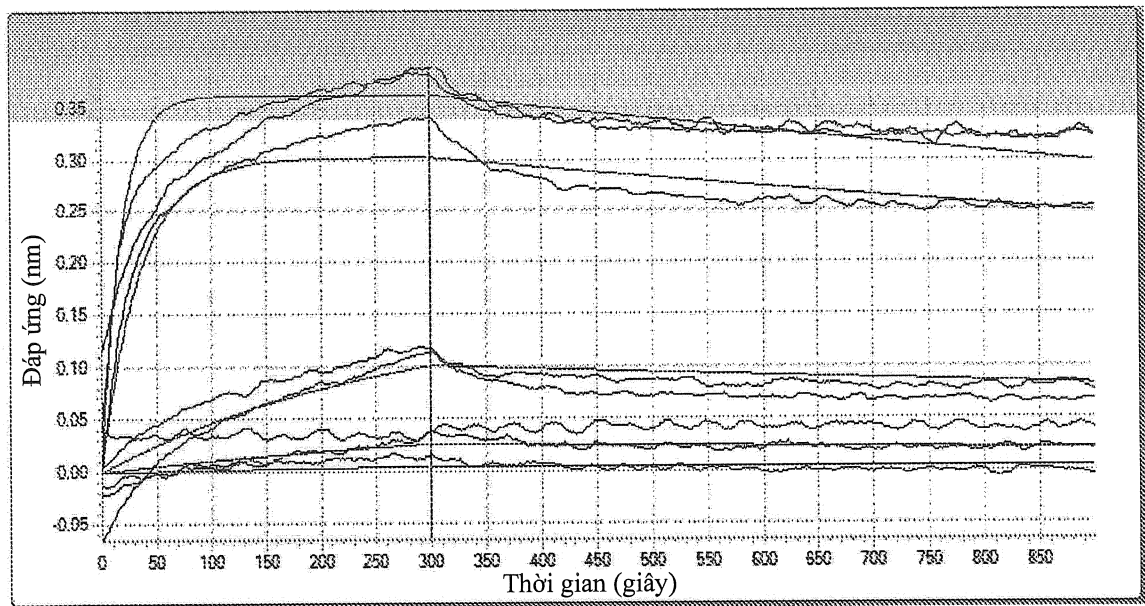


Fig. 12

6/15

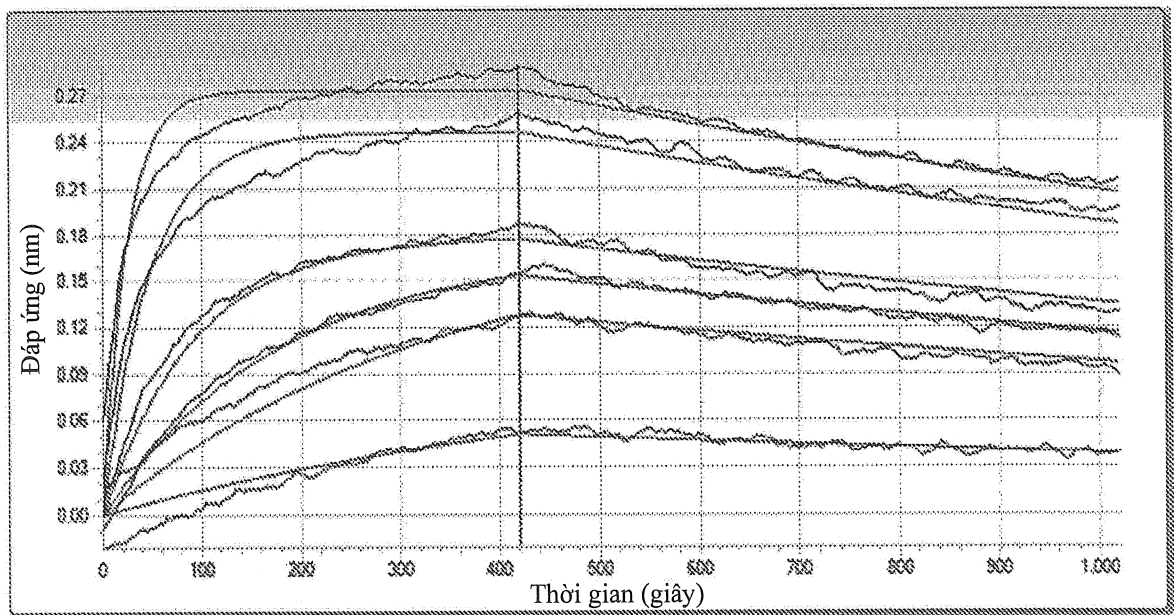


Fig. 13

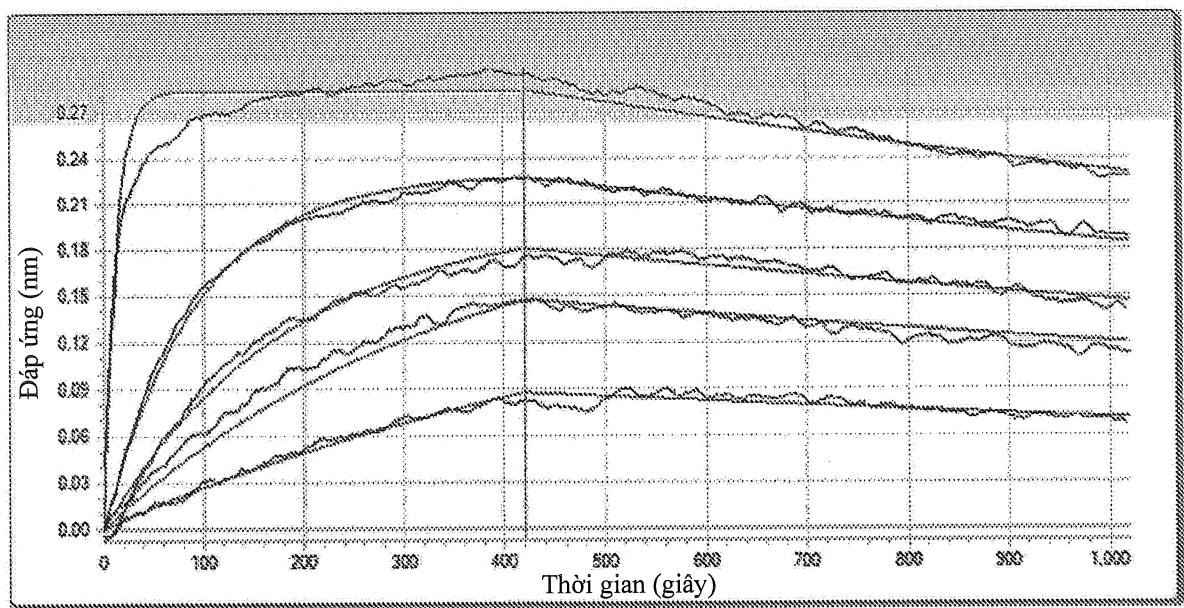


Fig. 14

7/15

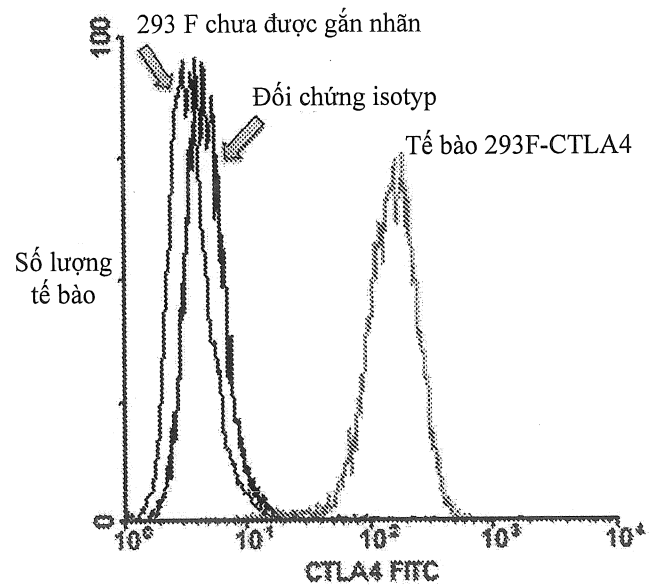


Fig. 15

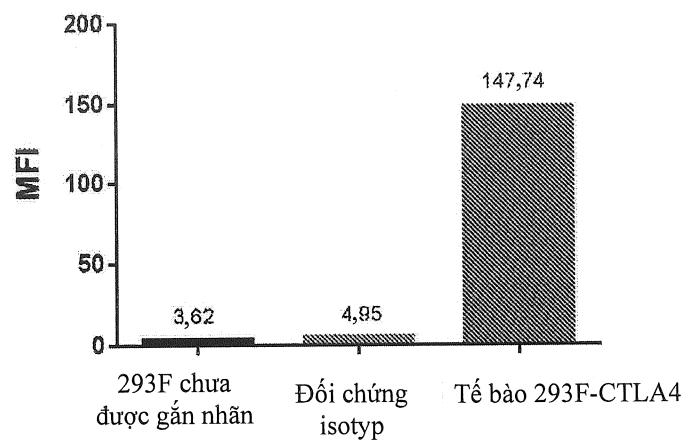


Fig. 16

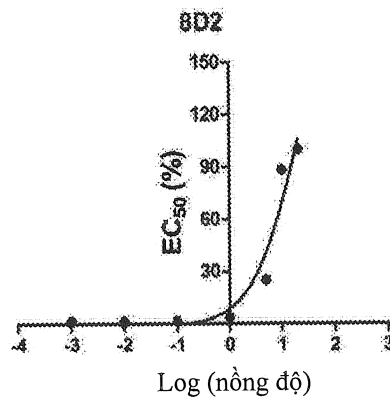


Fig. 17

8/15

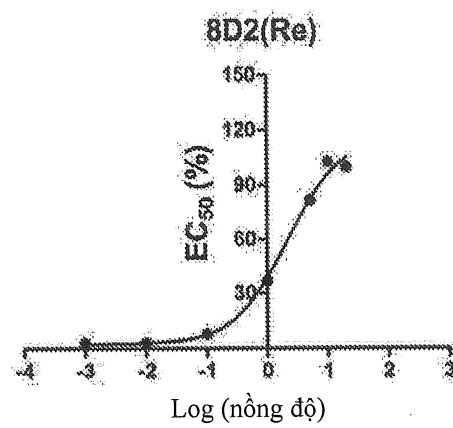


Fig. 18

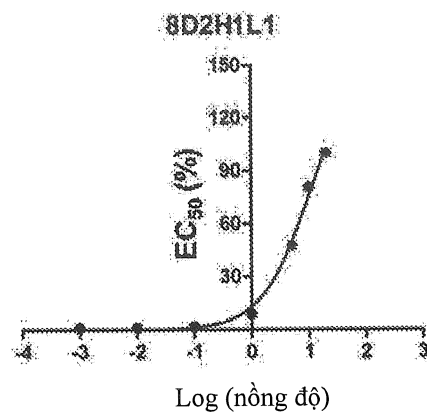


Fig. 19

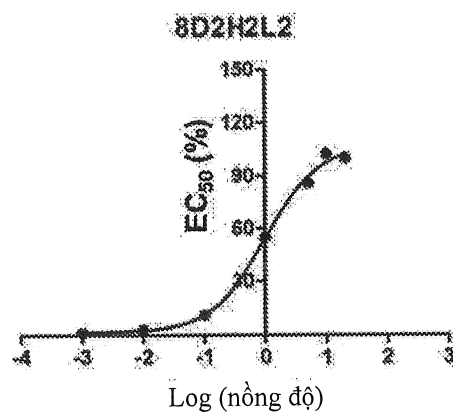


Fig. 20

9/15

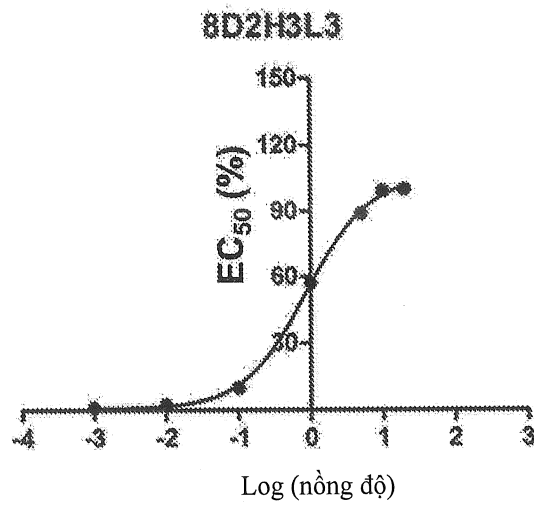


Fig. 21

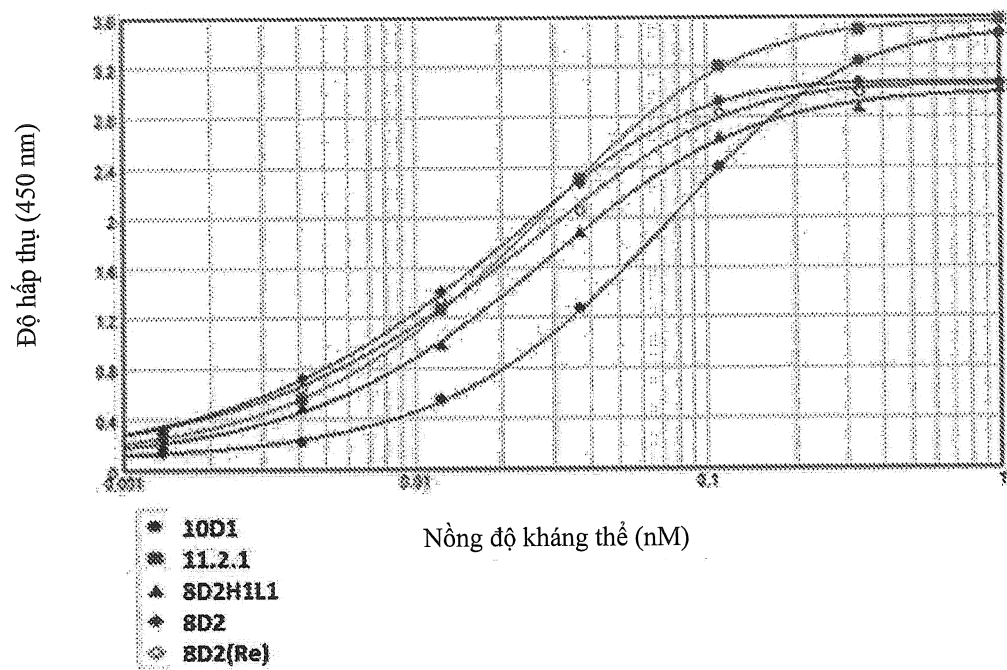


Fig. 22

10/15

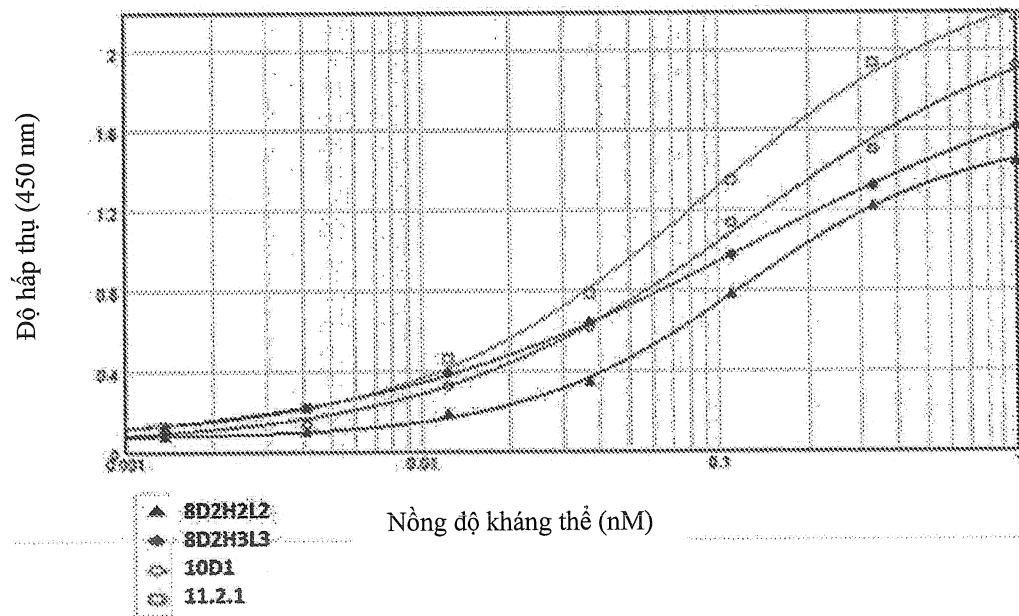


Fig. 23

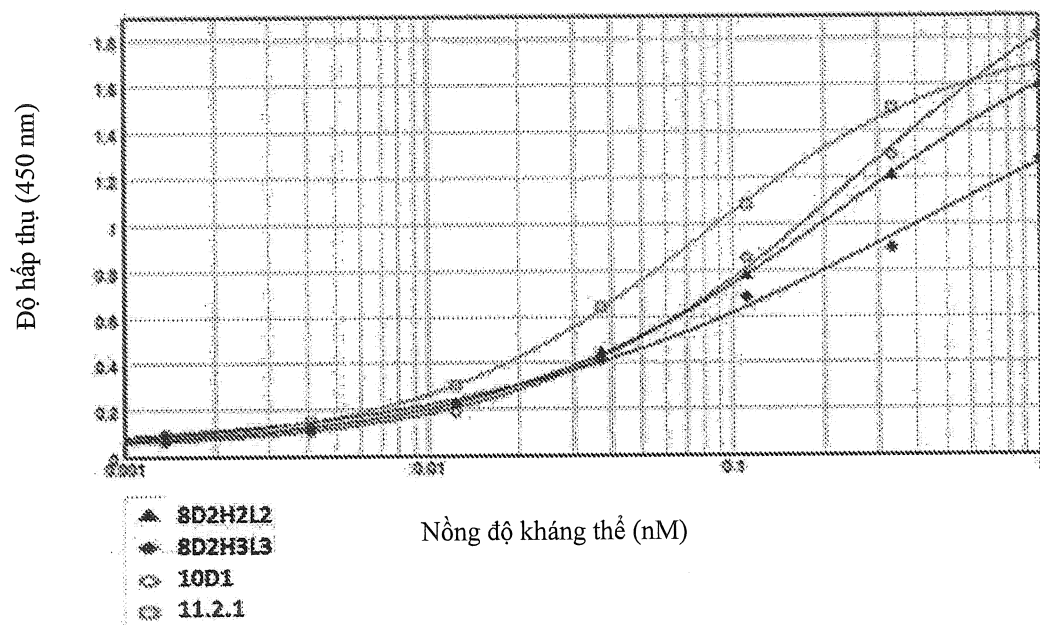


Fig. 24

11/15

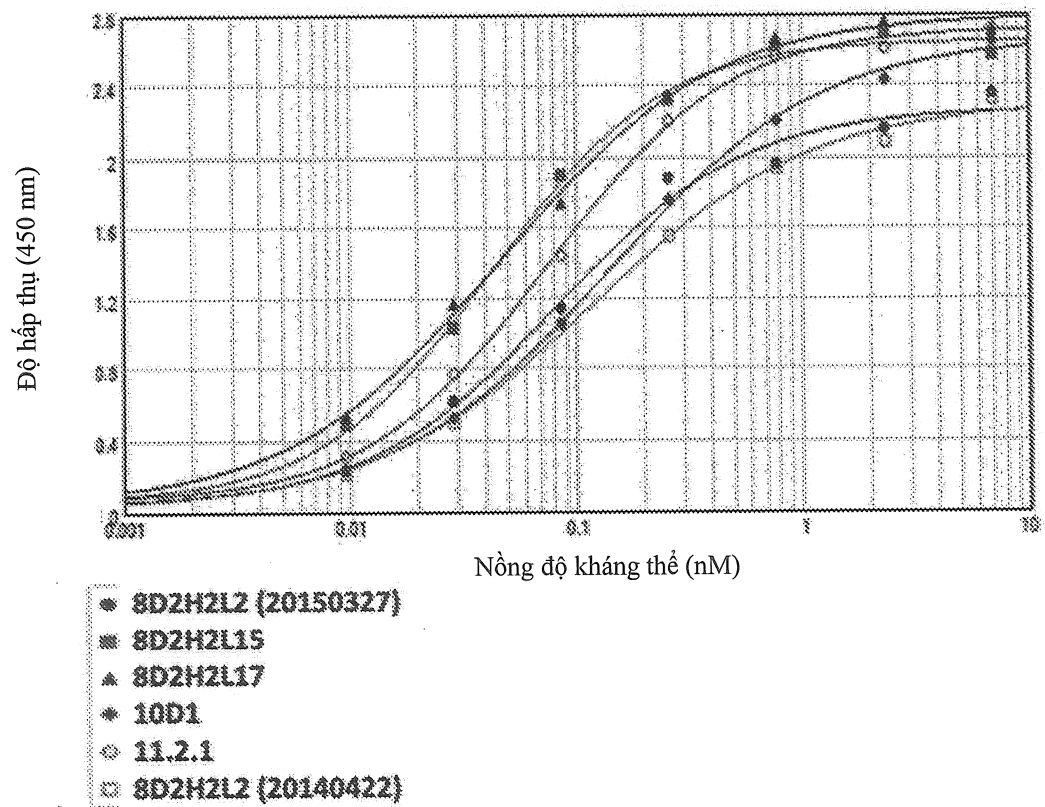


Fig. 25

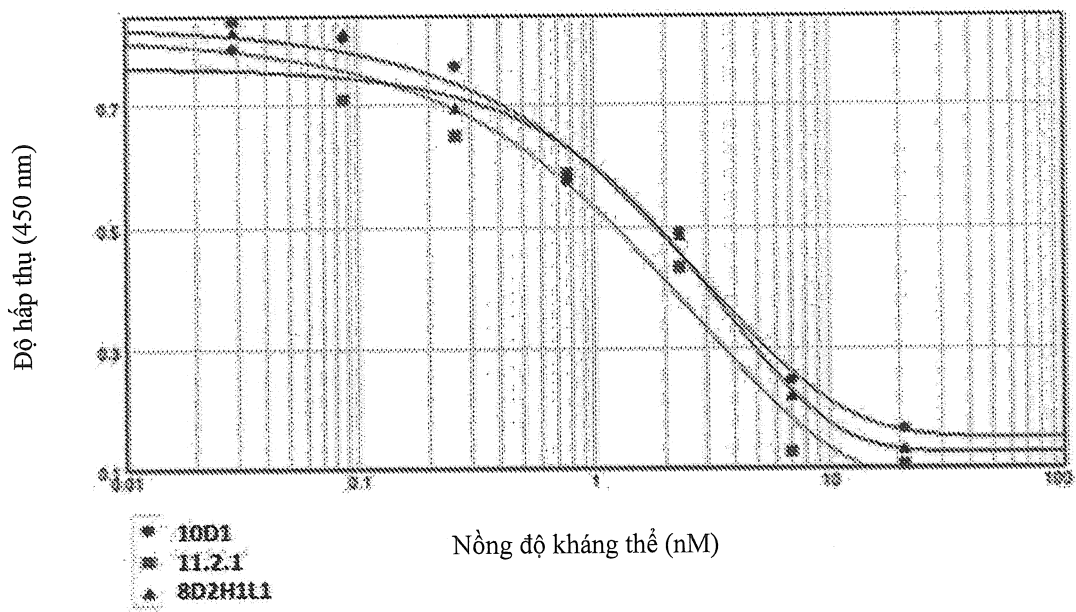


Fig. 26

12/15

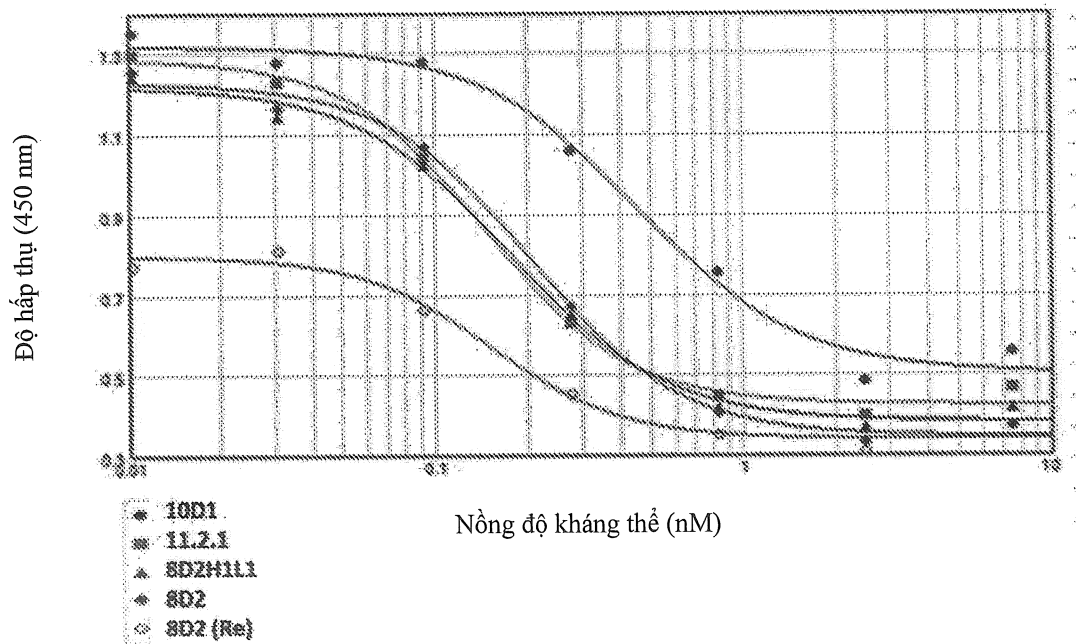


Fig. 27

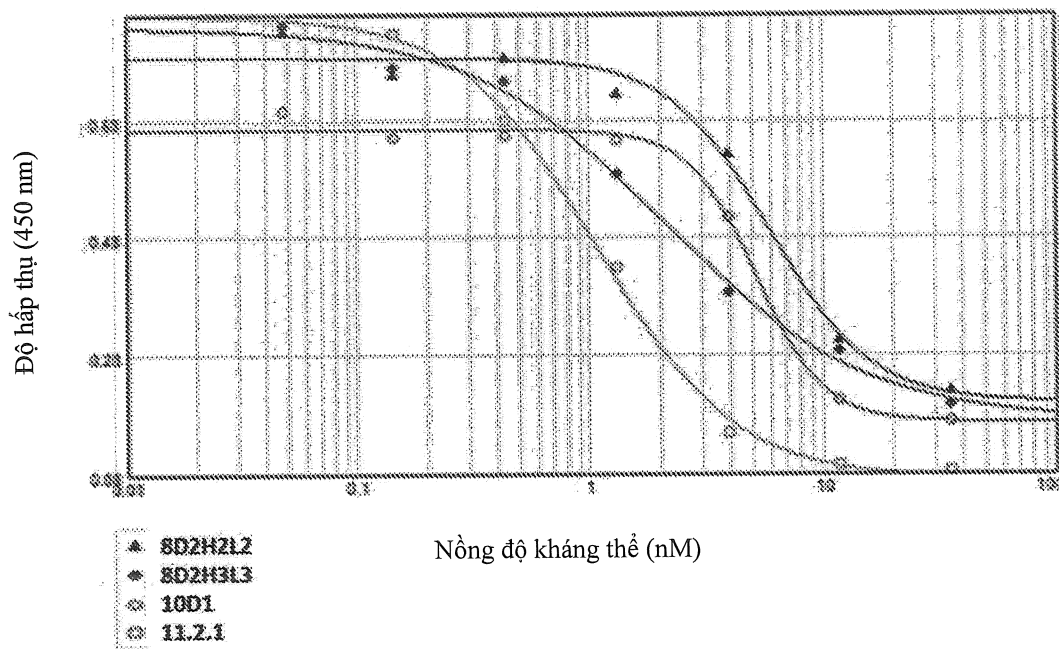


Fig. 28

13/15

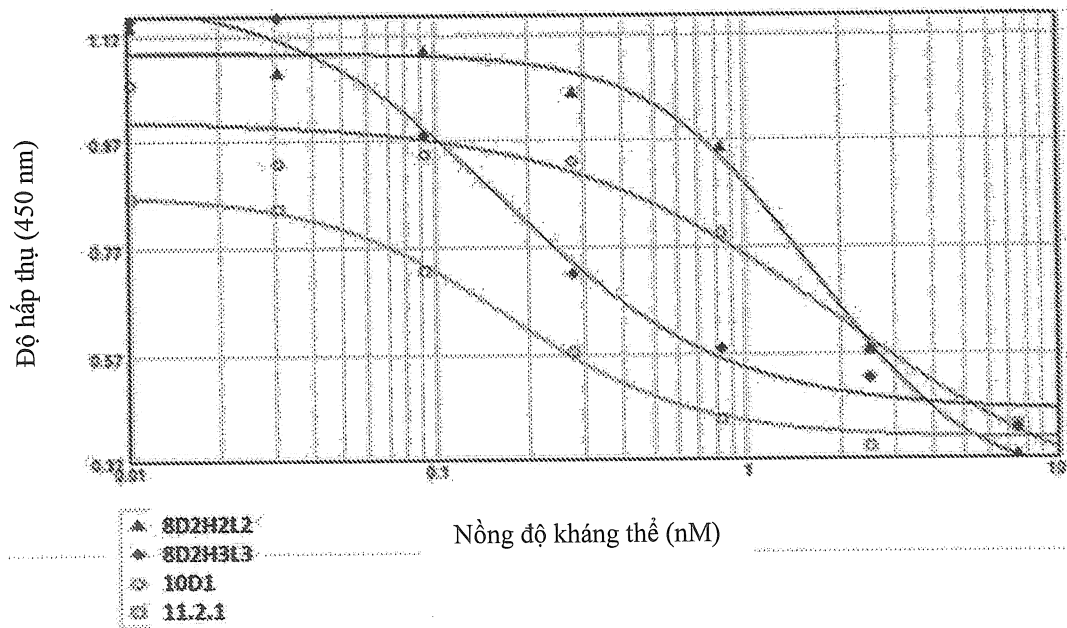


Fig. 29

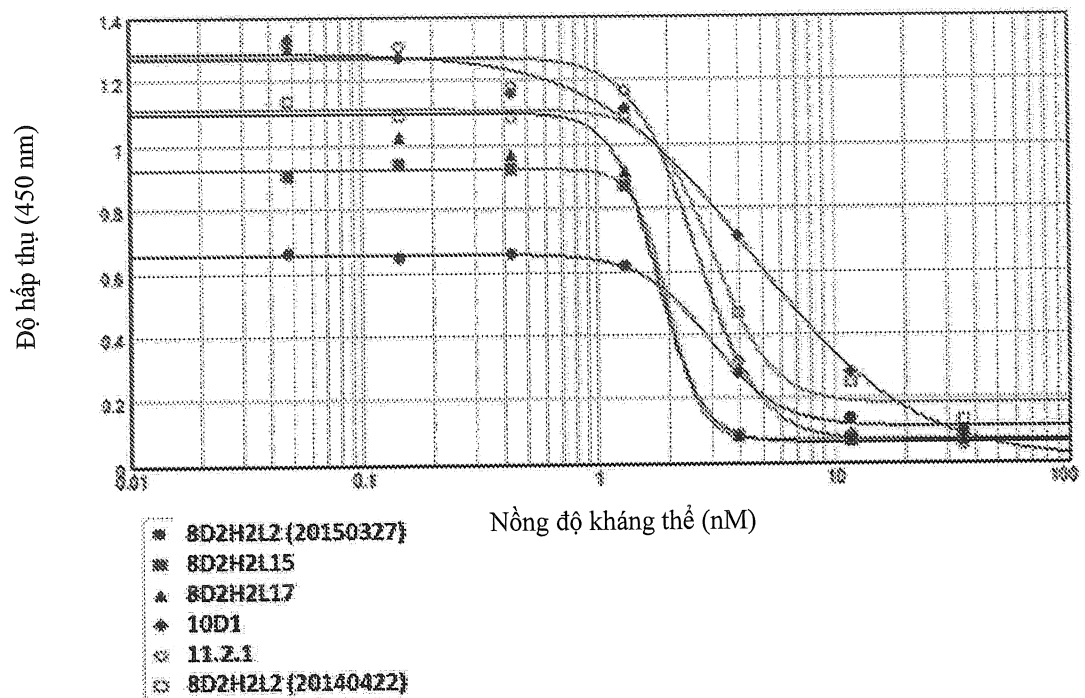


Fig. 30

14/15

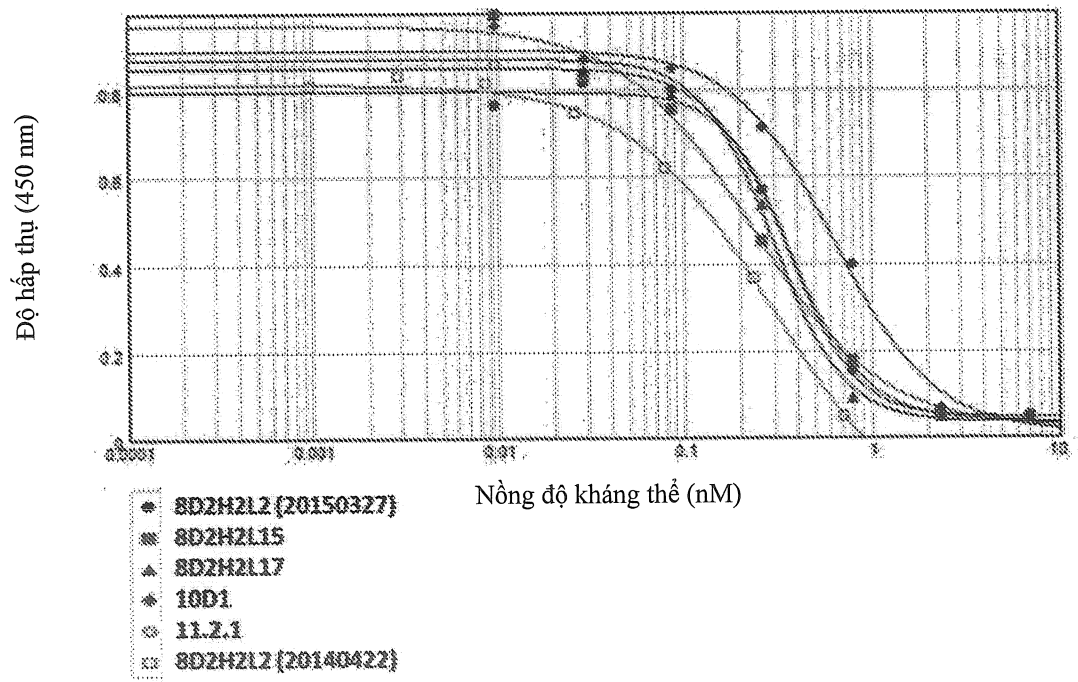


Fig. 31

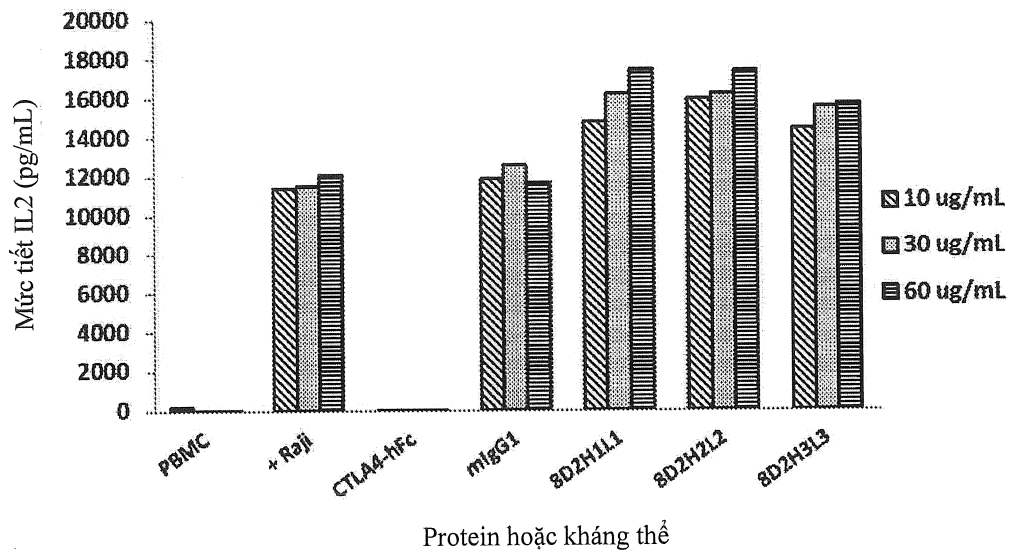


Fig. 32

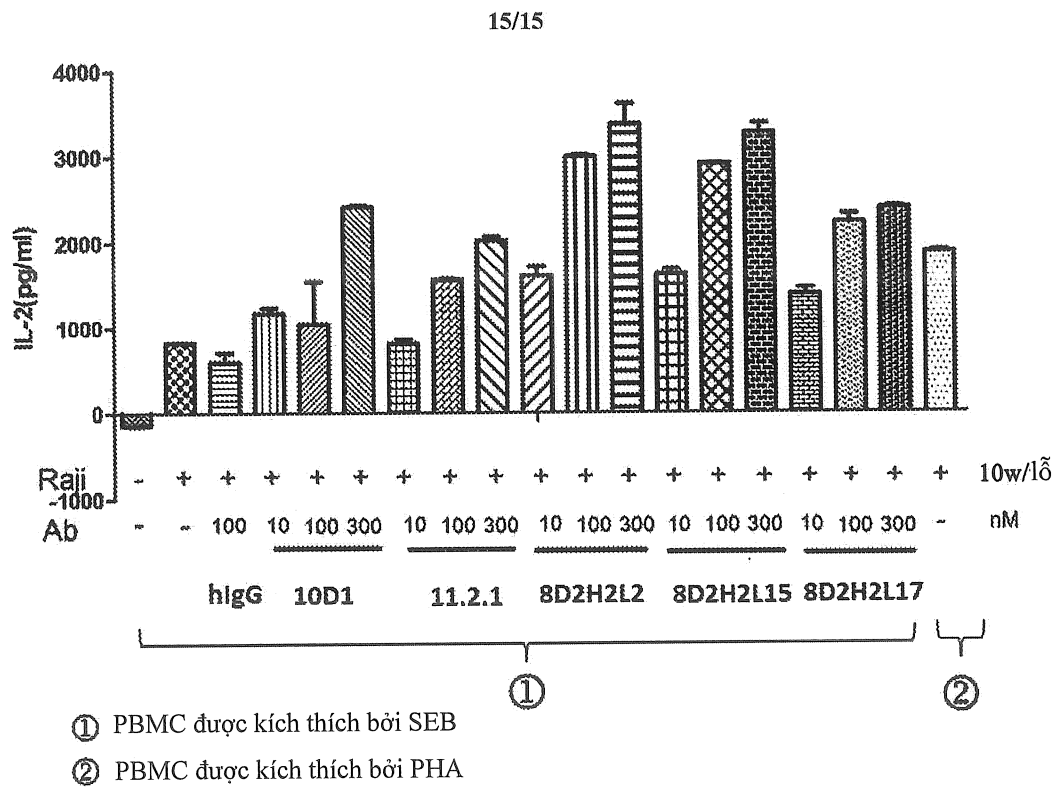


Fig. 33

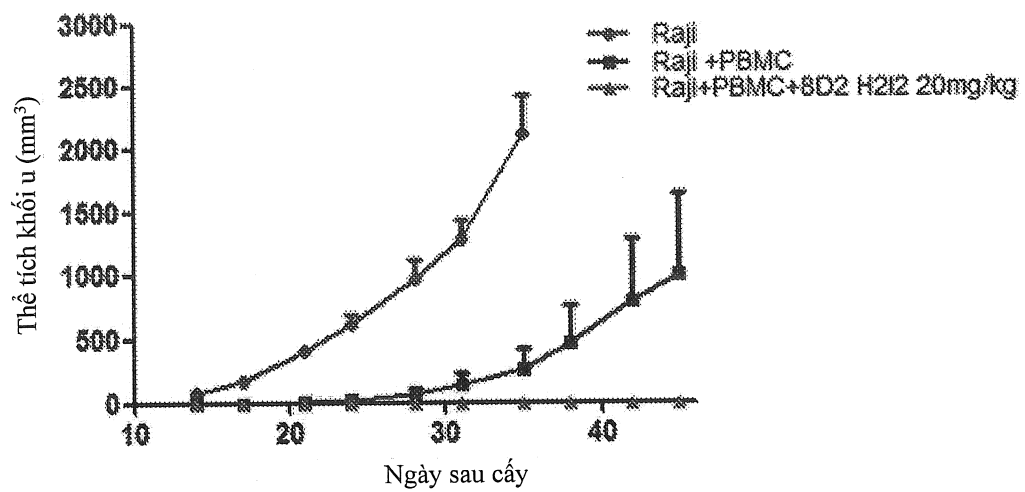


Fig. 34

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AKESO BIOPHARMA, INC.

<120> Kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên kết hợp lympho bào T gây độc tế bào 4 (CTLA4) hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> IEC150044PCT

<150> 201410377352.9

<151> 2014-08-01

<160> 34

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa protein CTLA4ECD

<400> 1

```

gcaatgcacg tggcccagcc tgctgtggta ctggccagca gccgaggcat cgccagcttt      60
gtgtgtgagt atgcatctcc aggcaaagcc actgaggtcc ggggtgacagt gcttcggcag      120
gctgacagcc aggtgactga agtctgtgcg gcaacctaca tgatggggaa tgagttgacc      180
ttcctagatg attccatctg cacgggcacc tccagtggaa atcaagtga cctcactatc      240
caaggactga gggccatgga cacgggactc tacatctgca aggtggagct catgtaccca      300
ccgccatact acctgggcat aggcaacgga acccagatgt atgtaattga tccagaaccg      360
tgcccagatt ctgac                                                         375

```

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của protein CTLA4ECD

<400> 2

```

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
1           5           10          15

```

```

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

```

```

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val

```

35

40

45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120 125

<210> 3

<211> 364

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của protein khâm CTLA4ECD-mFc

<400> 3

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
1 5 10 15

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

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Asn Leu
 115 120 125

Tyr Phe Gln Gly Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys
 130 135 140

Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
 145 150 155 160

Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
 165 170 175

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile
 180 185 190

Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr
 195 200 205

His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro
 210 215 220

Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 225 230 235 240

Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro
 245 250 255

Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu
 260 265 270

Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp
 275 280 285

Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
 290 295 300

Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 305 310 315 320

Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
 325 330 335

Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His
 340 345 350

His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

355

360

<210> 4
 <211> 1092
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit nucleic mã hóa protein khâm CTLA4ECD-mFc

<400> 4

```

gcaatgcatg tcgcacagcc tgcagtggct ctggcaagct ccaggggaat cgctagcttc      60
gtgtgcgaat acgcttcccc aggcaaggca accgaggtcc gggtgacagt cctgagacag      120
gccgacagcc aggtgacaga agtctgcgcc gctacttata tgatgggcaa cgagctgacc      180
tttctggacg atagcatttg taccgggaca tctagtggaa accaagtgaa tctgaccatc      240
cagggcctgc gcgctatgga cacagggctg tacatttgta aagtggagct gatgtatccc      300
cctccatact atctgggaat cggcaacggg acccagatct acgtgattga tcctgaacca      360
tgccccgact ccgatgagaa tctgtatttc cagggaccac gaggccccac aattaagcca      420
tgtccccctt gcaaatgtcc tgcaccaaac ctgctgggag gaccaagcgt gttcatcttt      480
ccaccaaga tcaaggacgt gctgatgatc tctactgagcc ccattgtgac ctgcgtggct      540
gtggacgtga gcgaggacga tcctgatgtg cagatcagtt ggttcgtcaa caatgtggaa      600
gtccacacag ctacagactca gaccatagg gaggattaca atagtactct gcgcgtcgtg      660
tcagcactgc ccattcagca ccaggactgg atgagcggca aggagttcaa gtgcaaagtg      720
aacaacaagg atctgcccgc acctatcgag agaactatct ccaagcctaa agggctctgtg      780
agggccccac aggtgtatgt cctgcctcca cccgaggaag agatgactaa gaaacaggtg      840
acactgactt gtatgggtcac cgacttcatg cccgaagata tctacgtgga gtggactaac      900
aatgggaaga ccgaactgaa ctataaaaaat acagagcctg tgctggactc agatggaagc      960
tactttatgt atagcaagct gcgagtggaa aagaaaaact gggtcgagcg gaacagctac     1020
tcttgtagtg tgggccacga agggctgcat aatcaccaca ccactaaatc attctcccga     1080
actccaggca aa                                                                1092

```

<210> 5
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2

<400> 5

```

gaggtgaaac tggacgaaac tggcgggggg ctggtgcagc ccggacgacc tatgaagctg      60
tcatgcgtcg ccagcggctt cacctttagc gacaactgga tgaattgggt gaggcagagc      120
ccagagaagg ggctggaatg gctggctcag atccgcaaca aaccctacaa ttatgagacc      180
tactattctg acagtgtgaa gggccggttc acaatttcca gagacgattc taaaagctcc      240
gtctacctgc agatgaacaa tctgagaggc gaagatatgg ggatctacta ttgcacagca      300
cagttcgctt attggggaca gggcactctg gtcacagtct ccgcc                        345

```

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2

<400> 6

```

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15

```

```

Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
                20              25              30

```

```

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

```

```

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
50              55              60

```

```

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65              70              75              80

```

```

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Met Gly Ile Tyr
85              90              95

```

```

Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100             105             110

```

```

Val Ser Ala
115

```

<210> 7

<211> 318

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2

<400> 7

```

gacattcaga tgacacagag tcctgcttcc ctgagtgcct cagtggggga gaccgtcaca      60
atcacttgcg gcacctctga aaacatctac ggcgggctga attggtatca gcggaagcag      120
ggcaaaagtc cccagctgct gatcttcgga gcaacaaacc tggccgacgg catgagctcc      180
cggtttagcg ggtccggatc tggcagacag tacagcctga agatttctag tctgcaccca      240
gacgatgtgg ctacttacta ttgccagaat gtcttgagga gtcccttcac ctttgggtca      300
ggaacaaagc tggagatc                                     318

```

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2

<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 Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
          20           25           30

```

```

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

```

```

Phe 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 Arg Ser Pro Phe
          85           90           95

```

```

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

```

<210> 9

<211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2H1L1

<400> 9
 gaagtgcagc tggctcgagtc cgggggggggc ctggtgcagc caggaggatc aatgcgactg 60
 agctgcgccg cttccggctt caccttcagc gacaactgga tgaattgggt caggcaggca 120
 ccaggaaagg gactggagtg gctggcacag atccgcaaca aaccttaca ctacgaaact 180
 tactacagcg actccgtgaa ggggcggttc accatttcta gagacgattc taaaaacagt 240
 gtgtacctgc agatgaatag cctgaagacc gaggatacag gagtctacta ttgtaccgca 300
 cagtttgctt attgggggca gggcactctg gtgacagtct cttca 345

<210> 10
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H1L1

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

Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H1L1

<400> 11
gacattcaga tgactcagag cccttcaagc ctgtccgcat ctgtgggcga ccgagtcacc 60
atcacatgca gaacctccga gaacatctac ggcgggctga attggtatca gcgaaagcag 120
gggaaaagtc ccaagctgct gatctacggg gcaacaaacc tggccagcgg aatgagctcc 180
agattcagtg gatcaggcag cgggacagat tatactctga aaatttctag tctgcaccca 240
gacgatgtgg caacctacta ttgccagaat gtcctgaggt cacccttcac ctttggaagc 300
ggcacaaaac tggagatcaa g 321

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H1L1

<400> 12

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 13
<211> 345
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2H2L2, 8D2H2L15 hoặc 8D2H2L17

<400> 13
gaagtgcagc tggctcgagtc cggggggggc ctgggtgcagc caggaggatc aatgcgactg 60
agctgcgccg cttccggctt caccttcagc gacaactgga tgaattgggt caggcaggca 120
ccaggaaagg gactggagtg gctggcacag atccgcaaca aaccttaca ctacgaaact 180
tactacagcg cctccgtgaa ggggcgggtc accatttcta gagacgattc taaaaacagt 240
gtgtacctgc agatgaatag cctgaagacc gaggatacag gagtctacta ttgtaccgca 300
cagtttgctt attgggggca gggcactctg gtgacagtct cttca 345

<210> 14
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2H2L2, 8D2H2L15 hoặc 8D2H2L17

<400> 14

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

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

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H2L2

<400> 15
 gacattcaga tgactcagag cccttcaagc ctgagtgcct cagtgggaga ccgggtcacc 60
 atcacatgca gaaccagcga gaacatctac ggcggcctga actggtatca gcgaaagcca 120
 ggcaagagcc ccaagctgct gatctacggg gcaaccaacc tggcctctgg agtgagctcc 180
 agattcagcg gcagcggctc tgggaccgac tatactctga ccatttctag tctgcagcct 240
 gaagatgtgg caacatacta ttgccagaat gtcctgaggt cccattcac ctttggatct 300
 ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H2L2

<400> 16

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

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

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

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

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

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

<210> 17

<211> 345

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2H3L3

<400> 17

gaggtgcagc tggctcgagtc tggaggcggc ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60
agctgcgcgc cttccggctt caccttcagc gacaactgga tgaattgggt gaggcaggca 120
cccggaaggg ggctggagtg ggtcgctcag atccgcaaca aaccttaca ttatgagaca 180
gaatacgagc cctctgtgaa ggggcggttc actattagta gagacgatag caagaacagc 240
gcctatctgc agatgaatag cctgaagacc gaagatacag ccgtctacta ttgtacagct 300
cagtttgcac actggggcca gggaactctg gtgaccgtca gctcc 345

<210> 18

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8D2H3L3

<400> 18

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

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

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H3L3

<400> 19
gacattcaga tgactcagag cccttcttct ctgtccgcat ctgtgggaga ccgggtcacc 60
atcacatgca gagccagcga gaacatctac ggcggcctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagctc ccaagctgct gatctacgga gcaacctccc tggcatctgg agtgccatcc 180
cggttcagtg gatcaggcag cgggaccgac tatactctga ccattagctc cctgcagcct 240
gaagacttcg ccacatacta ttgccagaac gtgctgaggt ccccatcac ctttggatct 300
ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H3L3

<400> 20

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

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

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

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 21

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H2L15

<400> 21

gacatccaga tgactcagtc tcccagctcc ctgtccgctt ctgtgggcga tcgggtcact 60

atcacctgta gaaccagcga gaacatttac ggcggactga attggtatca gaggaagccc 120

gggaaaagtc ctaagctgct gatctacgga gcaacaaacc tggcctccgg cgtgtctagt 180

cgcttcagtg gatcaggcag cgggaccgac tatacactga ctatttcaag cctgcagcca 240

gaggatgtgg ccacatacta ttgccagaat gtcctgagcc ggcaccccgg atttgggtca 300

gggaccaaac tggaaattaa g 321

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H2L15

<400> 22

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

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

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

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 23
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H2L17

<400> 23
gacatccaga tgactcagtc acccagctcc ctgagtgctt cagtgggcca tcgggtcact 60
atcacctgta gaaccagcga gaacatttac ggcggactga attggtatca gaggaagccc 120
gggaaaagcc ctaagctgct gatctacgga gcaacaaacc tggcctccgg cgtgtctagt 180
cgcttcagcg gcagcggctc tggaaccgac tatacactga ctatttcaag cctgcagcca 240
gaggatgtgg ccacatacta ttgccagaat gtcctgtcct ctcgaccgg atttggcagt 300
gggaccaaac tggaaattaa g 321

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 8D2H2L17

<400> 24

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 25
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit nucleic mã hóa CTLA4 protein

<400> 25
 atgggcgtcc tgctgactca gagaaccctg ctgtccctgg tgctggcact gctgtttcct 60
 tcaatggctt caatggctat gcatgtggct cagccagcag tggctctggc aagctccagg 120
 gggatcgcca gtttcgtgtg cgagtacgcc tcacctggaa aggctacaga agtccgggtg 180
 actgtcctga gacaggctga ctctcaggtg accgaggtct gcgccgctac atatatgatg 240
 ggcaacgaac tgacctttct ggacgattcc atttgtactg gcacctctag tgggaaccaa 300
 gtgaatctga ctatccaggg actgcgagca atggacaccg gactgtacat ttgcaaagtg 360
 gagctgatgt atccccctcc atactatctg ggcatcgga atggaacaca gatctacgtg 420
 attgatcccg aaccttgtcc agacagcgat ttctgtctgt ggattctggc agccgtgtca 480
 agcggcctgt tcttttatag ctttctgtgt actgccgtct ccctgtctaa gatgctgaag 540
 aaacgatccc ccctgaccac aggggtgggc gtgaaaatgc cacctaccga gcccgagtgc 600
 gaaaaacagt tccagccata ctttatccct atcaat 636

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

<220>
 <223> Trình tự axit amin của CTLA4 protein

<400> 26

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
145 150 155 160

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
165 170 175

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Val Val Lys
180 185 190

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
195 200 205

Ile Pro Ile Asn
210

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 27

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn Trp
1 5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 28

Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr
1 5 10

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 29

Thr Ala Gln Phe Ala Tyr
1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 30

Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
1 5

<210> 31

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 31

Gly Ala Thr
1

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 32

Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 33

Gln Asn Val Leu Ser Arg His Pro Gly
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của CDR

<400> 34

Gln Asn Val Leu Ser Ser Arg Pro Gly
1 5