



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0041437

(51)<sup>8</sup> C07K 16/42; A61P 35/00; A61K 39/395; (13) B  
A61P 33/06

(21) 1-2018-04830

(22) 02/05/2017

(86) PCT/CN2017/082713 02/05/2017

(87) WO 2017/186182 02/11/2017

(30) 201610285139.4 29/04/2016 CN

(45) 25/10/2024 439

(43) 25/03/2019 372A

(73) FOURTH MILITARY MEDICAL UNIVERSITY (CN)

No.169 West Changle Road, Xi'an, Shaanxi 710032, China

(72) CHEN, Zhinan (CN); ZHU, Ping (CN); HUANG, Wan (CN); ZHANG, Zheng (CN);  
ZHANG, Yang (CN); ZHANG, Mengyao (CN); BIAN, Huijie (CN); JIANG, Jianli  
(CN).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG BASIGIN ĐƯỢC LÀM GIỐNG NHƯ CỦA NGƯỜI VÀ  
CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng ( $V_H$ ) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; tùy ý còn chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ ( $V_L$ ) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trình tự axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vectơ chứa axit nucleic, và tế bào vật chủ chứa vectơ này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Nói chung, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người và việc sử dụng nó.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

BASIGIN (còn được gọi là EMMPRIN, Neurothelin và kháng nguyên M6) là glycoprotein xuyên màng có mức độ glycosyl hóa cao có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 50 đến 60 kD và là thành viên thuộc liên họ globulin miễn dịch (immunoglobulin superfamily - IgSF). Ở người, BASIGIN có 269 axit amin, mà có thể được chia vào các vùng ngoại bào, xuyên màng và nội bào, trong đó 21 gốc đầu tiên từ điểm khởi đầu dịch mã đầu tận cùng N cấu thành peptit tín hiệu, các gốc 22-205 cấu thành miền ngoại bào, các gốc 206-229 cấu thành vùng xuyên màng có cấu trúc khóa kéo leuxin điển hình, các gốc 230-269 ở đầu tận cùng C cấu thành miền nội bào.

Đã thấy rằng BASIGIN được biểu hiện quá mức trong nhiều loại khối u rắn của người như bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản hoặc bệnh ung thư dạ dày. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy rằng các phân tử BASIGIN là các protein màng chức năng quan trọng trong sự tiến triển của khối u và tham gia trong nhiều hiện tượng liên quan đến ung thư như sau:

i. BASIGIN điều phối sự bám dính và sự di căn của các tế bào khối u. BASIGIN được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào khối u tương tác với vinculin để thúc đẩy sự tạo thành chân giả, mở rộng và bám dính các tế bào khối u; tương tác với annexin II để thúc đẩy sự tiết MMP-2 trong các tế bào khối u; tăng tốc sự thoái hóa của chất nền bao quanh và thúc đẩy sự di căn của khối u thông qua việc kích thích các tế bào khối u và nguyên bào sợi quanh tế bào khối u tiết các metalloproteinaza chất

nền ngoại bào (MMP) khác nhau, ví dụ MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-11, MT1-MMP và MT2-MMP v.v..

ii. BASIGIN tham gia vào sự trao đổi chất kỵ khí của các tế bào khối u. BASIGIN là chaperon phân tử quan trọng của chất vận chuyển monocarboxylat MCT-1 và MCT-4. BASIGIN có thể tương tác với MCT-1 và MCT-4 để hỗ trợ việc định vị chính xác của chúng trên màng tế bào và tiếp tục điều hòa sự vận chuyển chất chuyển hóa lactat của chúng. Do các tế bào khối u chủ yếu dựa vào sự trao đổi chất kỵ khí để tạo ra năng lượng, BASIGIN điều hòa sự chuyển hóa năng lượng và chức năng của các tế bào khối u một cách gián tiếp thông qua sự biểu hiện của MCT.

iii. BASIGIN thúc đẩy tính kháng thuốc của các tế bào khối u. BASIGIN ảnh hưởng đến sự phiên mã của gen kháng nhiều thuốc (multidrug resistance - MDR) và thúc đẩy sự biểu hiện của P-g bằng cơ chế điều hòa sự đồng biểu hiện, và do đó, gây ra MDR của khối u. Kanekura và các đồng tác giả đã chứng minh rằng BASIGIN gây ra MDR thông qua P-g, cho thấy BASIGIN có thể là đích có hiệu quả tiềm tàng để ức chế MDR. Ngoài ra, BASIGIN thúc đẩy sự xác định vị trí nhân của p-TFII-I và điều chỉnh tăng sự biểu hiện của Bip, yếu tố then chốt trong đáp ứng protein không gấp cuộn (unfolded protein response - UPR), dẫn đến sự căng mạng lưới nội chất và UPR trong các tế bào khối u, nhờ đó ức chế sự chết tế bào theo chương trình và gây ra tính không miễn cảm thuốc. Sự ức chế BASIGIN có thể thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình của các tế bào caxinom tế bào gan và làm tăng tính miễn cảm của các tế bào khối u với các thuốc chống khối u hiện có.

iv. BASIGIN điều chỉnh tăng sự biểu hiện của VEGF để thúc đẩy sự tạo mạch khối u. Do đó, việc ức chế sự biểu hiện của BASIGIN có thể ức chế một cách đáng kể sự tiết VEGF và nhờ đó, ức chế sự tạo mạch khối u.

v. BASIGIN tương tác với nhiều phân tử. Vùng xuyên màng của protein BASIGIN có glutamat tích điện âm được bảo toàn cao, mà là cơ sở cấu trúc cho sự tương tác của nó với nhiều protein màng tế bào, và còn gợi ý rằng BASIGIN có thể ảnh hưởng đến nhiều hoạt tính sinh lý của tế bào thông qua các tương tác với nhiều

protein. BASIGIN tương tác với CD98, Integrin, caveolin-1, cyclophilin (CyP) và các protein khác làm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và sự di căn của các tế bào khối u bằng cách điều biến các chức năng của tế bào như sự chuyển hóa năng lượng, sự tương tác tế bào-chất nền, sự tải nạp tín hiệu v.v..

Ngoài ra, một số nghiên cứu hồi cứu đã thể hiện sự tương quan gần giữa mức độ biểu hiện của BASIGIN trong mô khối u và tiên lượng bệnh của bệnh nhân ung thư. Ở các bệnh nhân bị bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, mức độ biểu hiện của BASIGIN và tiên lượng bệnh của bệnh nhân có liên quan gần.

Do đó, BASIGIN đã trở thành đích mới để trị liệu khối u, và sự phát triển thành công của thuốc kháng thể "Licartin" đã chứng minh độ an toàn và hiệu quả của thuốc hướng đích BASIGIN.

Ngoài ra, sự tương tác giữa BASIGIN được biểu hiện trên hồng cầu và protein rhoptry PfRh5 của plasmodium falciparum theo cách phối tử-thụ thể điều phối sự nhận diện xa của hồng cầu bởi plasmodium falciparum, mà là yếu tố then chốt trong sự xâm lấn của plasmodium falciparum. Sự tương tác giữa PfRh5 và BASIGIN trên hồng cầu là ở các chủng khác nhau gây bệnh sốt rét, gợi ý rằng BASIGIN trên hồng cầu được kỳ vọng là đích quan trọng cho các thuốc chống sốt rét. Thuốc chống sốt rét mới dựa trên BASIGIN của người trên hồng cầu được sử dụng kết hợp với các thuốc chống sốt rét truyền thống để khắc phục tính kháng các thuốc hóa trị liệu.

Kháng thể đơn dòng (Monoclonal antibody - McAb) đã được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán và điều trị bệnh. Tuy nhiên, việc tiêm nhiều lần McAb của chuột vào trong cơ thể người có thể gây ra phản ứng của người kháng kháng thể của chuột nhất (human anti-mouse antibody - HAMA) ở bệnh nhân, phản ứng dị ứng toàn thân có thể cản trở hiệu quả của kháng thể. Do đó, kháng thể của người và kháng thể được làm giống như của người được nghiên cứu trong nghiên cứu và phát triển thuốc kháng thể để khai thác các ưu điểm tiềm tàng của chúng.

#### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người có ái lực gắn kết cao, và hoạt tính sinh học được kiểm tra thông qua các thử nghiệm.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng ( $V_H$ ).

Theo một số phương án,  $V_H$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (EVQLXESGGGLVQPGGSLRLSCXASGFTFSNFWMNWVRQAPGKGLEWVXEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKXXLYLQMNSLXTEDTXVYYCTSYDYEYWGQGTLLVTVSA), trong đó X ở vị trí i (i=5, 23, 49, 79, 80, 89, 94) của SEQ ID NO: 1 được gọi là  $X_{Hi}$ , mỗi  $X_{H5}$ ,  $X_{H23}$ ,  $X_{H49}$ ,  $X_{H79}$ ,  $X_{H80}$ ,  $X_{H89}$ ,  $X_{H94}$  có thể là axit amin bất kỳ.

Theo một số phương án,  $X_{H5}$  là V hoặc L. Theo một số phương án,  $X_{H23}$  là A hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{H49}$  là S, A hoặc G. Theo một số phương án,  $X_{H79}$  là N hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{H80}$  là T hoặc I. Theo một số phương án,  $X_{H89}$  là K hoặc R. Theo một số phương án,  $X_{H94}$  là A hoặc T.

Theo một số phương án, (a)  $X_{H5}$  là V,  $X_{H23}$  là A; và/hoặc (b)  $X_{H49}$  là S hoặc A; và/hoặc (c)  $X_{H79}$  là N,  $X_{H80}$  là T,  $X_{H89}$  là K hoặc R,  $X_{H94}$  là A.

Theo một số phương án,  $V_H$  chứa ba CDR của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO: 9-11.

Theo một số phương án,  $V_H$  chứa các vùng khung (framework region - FR) như được nêu trong SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15.

Theo một số phương án,  $V_H$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ ( $V_L$ ).

Theo một số phương án,  $V_L$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (DIQMTQSPXXLSXSVGDRVTXXCKASENVGTYVSWYQQKPGXXPKLLIYGA

SNRYTGVPXRFTGXGSGTDFTLTISSLQXXDXATYYCGQSYSPFTFGSGTKL EIK), trong đó X ở vị trí j ( $j = 9, 10, 13, 21, 22, 42, 43, 60, 65, 80, 81, 83$ ) của SEQ ID NO: 2 được gọi là  $X_{Lj}$ , mỗi  $X_{L9}, X_{L10}, X_{L13}, X_{L21}, X_{L22}, X_{L42}, X_{L43}, X_{L60}, X_{L65}, X_{L80}, X_{L81}, X_{L83}$  có thể là axit amin bất kỳ.

Theo một số phương án,  $X_{L9}$  là S, P hoặc A. Theo một số phương án,  $X_{L10}$  là T hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{L13}$  là A, L hoặc V. Theo một số phương án,  $X_{L21}$  là L hoặc I. Theo một số phương án,  $X_{L22}$  là S hoặc T. Theo một số phương án,  $X_{L42}$  là K hoặc Q. Theo một số phương án,  $X_{L43}$  là A, T hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{L60}$  là S hoặc A. Theo một số phương án,  $X_{L65}$  là S hoặc T. Theo một số phương án,  $X_{L80}$  là P hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{L81}$  là E hoặc D. Theo một số phương án,  $X_{L83}$  là F hoặc I.

Theo một số phương án, (a)  $X_{L9}$  là S hoặc A,  $X_{L10}$  là T hoặc S,  $X_{L13}$  là A,  $X_{L21}$  là L hoặc I,  $X_{L22}$  là S hoặc T; (b)  $X_{L42}$  là K hoặc Q,  $X_{L43}$  là A hoặc T; và/hoặc (c)  $X_{L60}$  là S,  $X_{L65}$  là S hoặc T,  $X_{L80}$  là P,  $X_{L81}$  là E hoặc D,  $X_{L83}$  là F.

Theo một số phương án,  $V_L$  chứa ba CDR của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO: 22-24.

Theo một số phương án,  $V_L$  chứa các FR như được nêu trong SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, và SEQ ID NO:28.

Theo một số phương án,  $V_L$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 hoặc SEQ ID NO:20.

Theo một số phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên là mảnh kháng thể được chọn từ  $F(ab')_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$ ,  $Fv$ ,  $scFv$ ,  $dsFv$ ,  $dAb$ , và polypeptit gắn kết đơn chuỗi.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng ổn định của chuỗi nặng IgG của người. Theo một số phương án, IgG của người là IgG2 của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng ổn định của chuỗi  $\kappa$  của người.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với BASIGIN với  $K_D$  nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11} M$  đến  $5 \times 10^{-10} M$  hoặc nằm trong khoảng từ  $5 \times 10^{-11} M$  đến  $1,1 \times 10^{-10} M$ .

Theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất trình tự axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, trình tự axit nucleic phân lập bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, hoặc SEQ ID NO:21.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ chứa vector được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào vật chủ là tế bào CHO.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN ở đối tượng, mà bao gồm việc cho đối tượng này dùng chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này với lượng có hiệu quả.

Theo một số phương án, tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN là bệnh ung thư hoặc bệnh sốt rét. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản hoặc bệnh ung thư dạ dày. Theo một số phương án, đối tượng này là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này để bào chế thuốc dùng để điều trị tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN ở đối tượng.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 là sơ đồ minh họa thể hiện các biến đổi minh họa nhất định ở các vị trí axit amin cụ thể trong các FR của chuỗi nặng của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người.

Fig.2 là sơ đồ minh họa thể hiện các biến đổi minh họa nhất định ở các vị trí axit amin cụ thể trong các FR của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người.

Fig.3 thể hiện sự gắn kết phụ thuộc liều của kháng thể kháng BASIGIN bao gồm 6H8 của chuột nhắt (hình thoi đặc), 6H8 khảm (hình tam giác đặc ngược), HP6H8-1 được làm giống như của người (hình tròn đặc), HP6H8-2 được làm giống như của người (hình tam giác đặc), HP6H8-3 được làm giống như của người (hình vuông đặc) với BASIGIN của người khi được đo bằng phân tích ELISA.

Fig.4 là sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện gen của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng BASIGIN pcDNA3.3-LC-N-229-205, trình tự mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được cài xen vào giữa các vị trí Xba I và Bsi WI của plasmid pcDNA3.3 tiếp theo là trình tự mã hóa vùng ổn định của chuỗi kappa của người.

Fig.5 là sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện gen của chuỗi nặng của kháng thể kháng BASIGIN pOptivec-HC-D-229-205, trình tự mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng được cài xen vào giữa các vị trí Xba I và Nhe I của plasmid pOptivec tiếp theo là trình tự mã hóa vùng ổn định của chuỗi nặng IgG2 của người.

Fig.6 thể hiện các kết quả về mức độ biểu hiện của kháng thể HP6H8-1 trong dòng tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO).



Fig.7 thể hiện các kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch của HP6H8-1 trong các mô ác tính của bệnh ung thư kết tràng, gan và phổi.

Fig.8 thể hiện các kết quả ức chế *in vitro* sự xâm lấn plasmodium falciparum của hồng cầu bởi kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1, trong đó dữ liệu kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình  $\pm$  S.E.M.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Phần mô tả sau của sáng chế chỉ được dự định để minh họa các phương án khác nhau của sáng chế. Như vậy, các cải biến cụ thể được bàn luận không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Sẽ hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng các phương án tương đương, các thay đổi, và các cải biến khác nhau có thể được thực hiện mà không vượt quá phạm vi của sáng chế, và cần phải hiểu rằng các phương án tương đương này được bao gồm trong bản mô tả này. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này, bao gồm các công bố, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

### **Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó**

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể” bao gồm globulin miễn dịch, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa hóa trị, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc kháng thể đặc hiệu kép (hai hóa trị) bất kỳ. Kháng thể nguyên vẹn nguyên thể chứa hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm vùng biến đổi ( $V_H$ ) và vùng ổn định thứ nhất, thứ hai, và thứ ba (lần lượt là  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ), trong khi mỗi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm vùng biến đổi ( $V_L$ ) và vùng ổn định ( $C_L$ ). Các vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chịu trách nhiệm về việc gắn kết kháng nguyên. Các vùng biến đổi trong cả hai chuỗi nói chung được chia nhỏ thành ba vùng có khả năng siêu biến được

gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) (trong đó, các CDR của chuỗi nhẹ (L) bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3, và các CDR của chuỗi nặng (H) bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3). Ranh giới CDR đối với các kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được xác định hoặc được nhận diện bằng các quy ước của Kabat, Chothia, hoặc Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. *et al.*, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. *et al.*, Nature. Dec 21-28;31(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A. *et al.*, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Theo một số phương án, ranh giới CDR của kháng thể được xác định theo cơ sở dữ liệu Kabat. Ba CDR được đặt xen giữa các dải bên sườn đã biết là các vùng khung (framework region - FR, trong đó FR chuỗi nặng (H) bao gồm HFR1, HFR2, HFR3 và HFR4, và FR chuỗi nhẹ (L) bao gồm LFR1, LFR2, LFR3 và LFR4), mà được bảo toàn cao hơn so với các CDR và tạo ra giá đỡ để hỗ trợ vòng siêu biến. Do đó, mỗi  $V_H$  và  $V_L$  chứa ba CDR và bốn FR theo thứ tự sau (các gốc axit amin đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng ổn định của các chuỗi nặng và nhẹ không tham gia vào việc gắn kết kháng nguyên, nhưng biểu hiện các chức năng hiệu ứng khác nhau.

Các chuỗi nặng của động vật có vú được phân loại là  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , và  $\mu$ , và các chuỗi nhẹ của động vật có vú được phân loại là  $\lambda$  hoặc  $\kappa$ . Các kháng thể được ấn định vào năm nhóm chính dựa vào trình tự axit amin của vùng ổn định của chuỗi nặng của chúng: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, mà lần lượt được đặc trưng bởi sự có mặt của các chuỗi nặng  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , và  $\mu$ . Các phân nhóm của một số nhóm kháng thể chính là, ví dụ, IgG1 (chuỗi nặng  $\gamma 1$ ), IgG2 (chuỗi nặng  $\gamma 2$ ), IgG3 (chuỗi nặng  $\gamma 3$ ), IgG4 (chuỗi nặng  $\gamma 4$ ), IgA1 (chuỗi nặng  $\alpha 1$ ), hoặc IgA2 (chuỗi nặng  $\alpha 2$ ).

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên mà có một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ một loài, và phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ loài khác được gọi là khảm. Theo một ví dụ minh họa,

kháng thể khảm có thể chứa vùng ổn định có nguồn gốc từ người và vùng biến đổi có nguồn gốc từ loài không phải người, như từ chuột nhắt.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người, được dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên mà chứa các CDR có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người (ví dụ, loài gặm nhấm, thỏ, chó, dê, ngựa, hoặc gà), và các FR vùng biến đổi và các vùng ổn định (nếu có) toàn bộ hoặc hầu hết là từ globulin miễn dịch của người.

“Hầu hết” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ mức độ tương tự cao giữa hai mục được so sánh (ví dụ, các trình tự, các trị số), và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ không coi như có sự khác biệt đáng kể giữa hai mục này, và/hoặc sẽ thấy trước rằng hai mục được so sánh có sự khác biệt nhỏ về các đặc tính của chúng (ví dụ, các đặc tính vật lý, hoặc hoạt tính sinh học).

Theo một số phương án, trình tự của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người được biến đổi (ví dụ, được thay thế, được cài xen hoặc được làm mất đoạn) để cải thiện kháng thể về một hoặc nhiều đặc tính, như ái lực gắn kết, độ ổn định, khả năng sinh miễn dịch, thời gian bán thải dược động học, tính miễn cảm với độ pH, khả năng tương hợp với việc tiếp hợp v.v.. Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc axit amin trong một hoặc nhiều CDR không phải của người và/hoặc FR của người được biến đổi để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính đã nêu trên của kháng thể trong khi duy trì hoặc cải thiện ái lực gắn kết của kháng thể, trong đó các gốc axit amin đã được biến đổi là không có tính quyết định trong việc gắn kết đặc hiệu hoặc các biến đổi là các thay đổi bảo toàn, sao cho việc gắn kết của kháng thể được làm giống như của người với BASIGIN không bị tác động đáng kể.

Theo một số phương án, CDR có nguồn gốc từ các kháng thể không phải của người có thể bao gồm trình tự axit amin giống như CDR không phải của người mà nó có nguồn gốc từ đó, hoặc nó có thể bao gồm không quá 3, không quá 2, hoặc không quá 1 biến đổi axit amin. Theo một số phương án, các biến đổi này là các thay thế bảo toàn.

“Thay thế bảo toàn” liên quan đến trình tự axit amin được dùng để chỉ việc thay thế gốc axit amin bằng gốc axit amin khác có mạch bên có đặc tính sinh hóa tương tự hoặc sự thay thế của các axit amin mà không có tính quyết định đối với hoạt tính của polypeptit. Ví dụ, các thay thế bảo toàn có thể được thực hiện trong số các gốc axit amin có mạch bên không phân cực (ví dụ, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe và Trp), trong số các gốc có mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, Cys, Ser, Thr, Asn, Gly và Gln), trong số các gốc có mạch bên có tính axit (ví dụ, Asp và Glu), trong số các axit amin có mạch bên có tính bazơ (ví dụ, His, Lys và Arg), trong số các axit amin có mạch bên phân nhánh beta (ví dụ, Thr, Val và Ile), trong số các axit amin có mạch bên chứa lưu huỳnh (ví dụ, Cys và Met), hoặc trong số các gốc có mạch bên thơm (ví dụ, Trp, Tyr, His và Phe). Theo một số phương án, các thay thế, các mất đoạn hoặc các thêm đoạn cũng có thể được coi là “sự thay thế bảo toàn” miễn là các thay thế, các mất đoạn, hoặc các thêm đoạn này không gây ra sự thay đổi đáng kể về cấu trúc cấu hình riêng của protein, và do đó, có thể giữ được hoạt tính sinh học của protein. Số lượng các axit amin mà được cài xen hoặc được làm mất đoạn dưới dạng thay thế bảo toàn có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng ( $V_H$ ). Theo một số phương án,  $V_H$  chứa các CDR được nêu trong SEQ ID NO: 9-11. Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ ( $V_L$ ). Theo một số phương án,  $V_L$  chứa các CDR được nêu trong SEQ ID NO: 22-24.

Theo một số phương án, phần mềm máy tính có thể được sử dụng để mô phỏng thực tế việc gắn kết của các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên với BASIGIN của người, và do đó, nhận diện các vị trí axit amin trên các kháng thể/các mảnh (ví dụ, các FR) mà không có tính quyết định trong việc gắn kết. Các axit amin khác nhau có thể được kiểm tra các vị trí như vậy trong quá trình mô phỏng để nhận diện các axit amin không làm thay đổi cấu trúc/cấu hình riêng của phần gắn kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc tùy ý cải thiện một hoặc nhiều đặc

tính của các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên, như mức độ gắn kết hoặc ái lực gắn kết, độ ổn định, khả năng sinh miễn dịch, thời gian bán thải được động học, tính miễn cảm với độ pH, khả năng tương hợp với việc tiếp hợp v.v.. Các ví dụ về phần mềm máy tính như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SYBYL, Discovery Studio, MOE, AMBER, GROMACS, NAMD, CONCOORD, DynDom, Autodock, MODELER, MolMol v.v..

Theo một số phương án, các vùng FR của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể chứa một số biến đổi axit amin ở, ví dụ, không quá 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 các vị trí axit amin. Theo một số phương án, các vùng FR của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là tương đồng với các FR không phải của người.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “thể tương đồng” và “tương đồng” được sử dụng thay thế được cho nhau và chỉ các trình tự axit amin hoặc các trình tự axit nucleic (hoặc sợi bổ sung của nó) mà có mức độ đồng nhất trình tự là ít nhất 80% (ví dụ, ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) so với các trình tự khác khi được bắt cặp tùy ý.

Tỷ lệ phần trăm (%) “mức độ đồng nhất trình tự” đối với trình tự axit amin (hoặc trình tự axit nucleic) được xác định là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin (hoặc axit nucleic) trong trình tự dự tuyển mà giống với các gốc axit amin (hoặc axit nucleic) trong trình tự tham chiếu, sau khi bắt cặp các trình tự và, nếu cần, đưa các khoảng trống vào, để đạt được mức độ tương ứng lớn nhất. Sự bắt cặp nhằm các mục đích xác định tỷ lệ phần trăm mức độ đồng nhất trình tự axit amin (hoặc axit nucleic) có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng các công cụ có sẵn công khai như phần mềm BLASTN, BLASTp, ClustalW2, và ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR).

Theo một số phương án,  $V_H$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1  
(EVQLXESGGGLVQPGGSLRLSCXASGFTFSNFWMNWVRQAPGKGLEWVXEI  
RLKSNINYATHYAESVKGRFTISRDDSKXXLYLQMNSLXTEDTXVYYCTSYD

YEYWGQGTLVTVSA), trong đó X ở vị trí i ( $i=5, 23, 49, 79, 80, 89, 94$ ) của SEQ ID NO: 1 được gọi là  $X_{Hi}$ , mỗi  $X_{H5}, X_{H23}, X_{H49}, X_{H79}, X_{H80}, X_{H89}, X_{H94}$  có thể là axit amin bất kỳ. Theo một số phương án,  $V_H$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

1

(EVQLXESGGGLVQPGGSLRLSCXASGFTFSNFWMNWVRQAPGKGLEWVXEI  
RLKSNINYATHYAESVKGRFTISRDDSKXXLYLQMNSLXTEDTXVYYCTSYD  
YEYWGQGTLVTVSA), trong đó X ở vị trí i ( $i=5, 23, 49, 79, 80, 89, 94$ ) của SEQ ID NO: 1 được gọi là  $X_{Hi}$ , mỗi  $X_{H5}, X_{H23}, X_{H49}, X_{H79}, X_{H80}, X_{H89}, X_{H94}$  có thể là axit amin bất kỳ.

Theo một số phương án,  $X_{H5}$  là V hoặc L. Theo một số phương án,  $X_{H23}$  là A hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{H49}$  là S, A hoặc G. Theo một số phương án,  $X_{H79}$  là N hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{H80}$  là T hoặc I. Theo một số phương án,  $X_{H89}$  là K hoặc R. Theo một số phương án,  $X_{H94}$  là A hoặc T.

Theo một số phương án, (a)  $X_{H5}$  là V,  $X_{VH23}$  là A; và/hoặc (b)  $X_{VH49}$  là S hoặc A; và/hoặc (c)  $X_{VH79}$  là N,  $X_{H80}$  là T,  $X_{VH89}$  là K hoặc R,  $X_{VH94}$  là A.

Theo một số phương án,  $X_{H5}$  là V,  $X_{VH23}$  là A. Theo một số phương án,  $X_{H49}$  là S hoặc A. Theo một số phương án,  $X_{H49}$  là S. Theo một số phương án,  $X_{H49}$  là A. Theo một số phương án,  $X_{H79}$  là N,  $X_{H80}$  là T,  $X_{H89}$  là K,  $X_{H94}$  là A. Theo một số phương án,  $X_{H79}$  là N,  $X_{H80}$  là T,  $X_{H89}$  là R,  $X_{H94}$  là A.

Theo một số phương án,  $V_H$  chứa một hoặc nhiều FR của chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: 12-15. Theo một số phương án,  $V_H$  bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7. Theo một số phương án,  $V_H$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ  $V_L$ . Theo một số phương án,  $V_L$  chứa các CDR được nêu trong SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24.

Theo một số phương án,  $V_L$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (DIQMTQSPXXLSXSVGDRVTXXCKASENVGTYVSWYQQKPGXXPKLLIYGA SNRYTGVPXRFTGXGSGTDFTLTISSLQXXDXATYYCGQSYSPFTFGSGTKL EIK), trong đó X ở vị trí j (j = 9, 10, 13, 21, 22, 42, 43, 60, 65, 80, 81, 83) của SEQ ID NO: 43 được gọi là  $X_{Lj}$ , mỗi  $X_{L9}$ ,  $X_{L10}$ ,  $X_{L13}$ ,  $X_{L21}$ ,  $X_{L22}$ ,  $X_{L42}$ ,  $X_{L43}$ ,  $X_{L60}$ ,  $X_{L65}$ ,  $X_{L80}$ ,  $X_{L81}$ ,  $X_{L83}$  có thể là axit amin bất kỳ. Theo một số phương án,  $V_L$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2

(DIQMTQSPXXLSXSVGDRVTXXCKASENVGTYVSWYQQKPGXXPKLLIYGA SNRYTGVPXRFTGXGSGTDFTLTISSLQXXDXATYYCGQSYSPFTFGSGTKL EIK), trong đó X ở vị trí j (j = 9, 10, 13, 21, 22, 42, 43, 60, 65, 80, 81, 83) của SEQ ID NO: 43 được gọi là  $X_{Lj}$ , mỗi  $X_{L9}$ ,  $X_{L10}$ ,  $X_{L13}$ ,  $X_{L21}$ ,  $X_{L22}$ ,  $X_{L42}$ ,  $X_{L43}$ ,  $X_{L60}$ ,  $X_{L65}$ ,  $X_{L80}$ ,  $X_{L81}$ ,  $X_{L83}$  có thể là axit amin bất kỳ.

Theo một số phương án,  $X_{L9}$  là S, P hoặc A. Theo một số phương án,  $X_{L10}$  là T hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{L13}$  là A, L hoặc V. Theo một số phương án,  $X_{L21}$  là L hoặc I. Theo một số phương án,  $X_{L22}$  là S hoặc T. Theo một số phương án,  $X_{L42}$  là K hoặc Q. Theo một số phương án,  $X_{L43}$  là A, T hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{L60}$  là S hoặc A. Theo một số phương án,  $X_{L65}$  là S hoặc T. Theo một số phương án,  $X_{L80}$  là P hoặc S. Theo một số phương án,  $X_{L81}$  là E hoặc D. Theo một số phương án,  $X_{L83}$  là F hoặc I.

Theo một số phương án, (a)  $X_{L9}$  là S hoặc A,  $X_{L10}$  là T hoặc S,  $X_{L13}$  là A,  $X_{L21}$  là L hoặc I,  $X_{L22}$  là S hoặc T; (b)  $X_{L42}$  là K hoặc Q,  $X_{L43}$  là A hoặc T; và/hoặc (c)  $X_{L60}$  là S,  $X_{L65}$  là S hoặc T,  $X_{L80}$  là P,  $X_{L81}$  là E hoặc D,  $X_{L83}$  là F.

Theo một số phương án,  $X_{L9}$  là S,  $X_{L10}$  là T,  $X_{L13}$  là A,  $X_{L21}$  là L,  $X_{L22}$  là S. Theo một số phương án,  $X_{L9}$  là A,  $X_{L10}$  là S,  $X_{L13}$  là A,  $X_{L21}$  là I,  $X_{L22}$  là S. Theo một số phương án,  $X_{L9}$  là S,  $X_{L10}$  là S,  $X_{L13}$  là A,  $X_{L21}$  là L,  $X_{L22}$  là T.

Theo một số phương án,  $X_{L42}$  là K,  $X_{L43}$  là A. Theo một số phương án,  $X_{L42}$  là Q,  $X_{L43}$  là T. Theo một số phương án,  $X_{L42}$  là Q,  $X_{L43}$  là A.

Theo một số phương án,  $X_{L60}$  là S,  $X_{L65}$  là S,  $X_{L80}$  là P,  $X_{L81}$  là E,  $X_{L83}$  là F.  
 Theo một số phương án,  $X_{L60}$  là S,  $X_{L65}$  là S,  $X_{L80}$  là P,  $X_{L81}$  là D,  $X_{L83}$  là F.

Theo một số phương án,  $V_L$  chứa một hoặc nhiều FR được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25-28.

Theo một số phương án,  $V_L$  bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 hoặc SEQ ID NO:20. Theo một số phương án,  $V_L$  có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 hoặc SEQ ID NO:20.

Theo một số phương án, các kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng chứa chuỗi nặng chứa vùng ổn định của chuỗi nặng IgA, IgD, IgE, IgG, hoặc IgM của người. Theo một số phương án, chuỗi nặng này chứa vùng ổn định của chuỗi nặng IgG của người. Theo một số phương án, IgG của người là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người. Theo một số phương án, IgG của người là IgG2 của người. Theo một số phương án, các kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh của chúng chứa chuỗi nhẹ chứa vùng ổn định của chuỗi  $\lambda$  hoặc  $\kappa$  của người. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ này chứa vùng ổn định của chuỗi  $\kappa$  của người.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người được đề xuất trong bản mô tả này chứa: ba CDR của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO: 9-11, các trình tự khung của chuỗi nặng là HFR1, HFR2, HFR3 và HFR4 như được nêu trong SEQ ID NO: 12-15, các CDR của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO: 22-24 và các trình tự khung của chuỗi nhẹ là LFR1, LFR2, LFR3 và LFR4 như được nêu trong SEQ ID NO: 25-28, trong đó các trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng là theo công thức:

HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4, và các trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là theo công thức  
 LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người là hữu ích làm biện pháp trị liệu cho người. Theo một số phương án, do nó có khả năng



sinh miễn dịch giảm hoặc ít có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở người, so với kháng thể của loài không phải người. Theo một số phương án, động vật không phải người là động vật có vú, ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, dê, cừu, chuột lang, chuột hamster, hoặc động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ (ví dụ, khỉ cynomolgus hoặc khỉ nâu) hoặc khỉ hình người (ví dụ, tinh tinh, khỉ đột, khỉ không đuôi hoặc khỉ affen)).

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” hoặc “gắn kết một cách đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phản ứng gắn kết không ngẫu nhiên giữa hai phân tử, ví dụ, như giữa kháng thể và kháng nguyên. Ái lực gắn kết có thể được biểu thị bằng trị số  $K_D$ , mà được tính dưới dạng tỷ lệ của tốc độ phân ly ( $k_{off}$ ) và tốc độ liên kết ( $k_{on}$ ), tức là  $k_{off}/k_{on}$ , khi gắn kết giữa kháng nguyên và kháng thể đạt đến sự cân bằng. Trị số  $K_D$  có thể được xác định một cách thích hợp bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, thử nghiệm gắn kết cộng hưởng plasmon (SPR) bằng cách sử dụng các dụng cụ như Biacore (xem, ví dụ, Murphy, M. et al, Current protocols in protein science, Chapter 19, unit 19.14, 2006).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng BASIGIN và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng được đề xuất trong bản mô tả này có khả năng gắn kết đặc hiệu với BASIGIN của người với ái lực gắn kết ( $K_D$ ) khoảng  $10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn (ví dụ,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M) khi được đo bằng thử nghiệm gắn kết cộng hưởng plasmon. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với BASIGIN của người và/hoặc không phải của người với ái lực gắn kết ( $K_D$ ) nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11}$  M đến  $1 \times 10^{-7}$  M, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11}$  M đến  $1 \times 10^{-8}$  M, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11}$  M đến  $5 \times 10^{-9}$  M, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11}$  M đến  $1 \times 10^{-9}$  M, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11}$  M đến  $1 \times 10^{-9}$  M, nằm trong khoảng từ  $5 \times 10^{-11}$  M đến  $5 \times 10^{-10}$  M hoặc nằm trong khoảng từ  $5 \times 10^{-11}$  M đến  $1,1 \times 10^{-11}$  M. Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với BASIGIN với  $K_D$  nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^{-11}$  M đến  $5 \times 10^{-10}$  M, hoặc nằm trong khoảng từ  $5 \times 10^{-11}$  M đến  $1,1 \times 10^{-10}$  M.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng BASIGIN và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với BASIGIN của người nhưng không gắn kết đặc hiệu với BASIGIN của chuột nhắt, ví dụ, ái lực gắn kết với BASIGIN của chuột nhắt là nhỏ hơn 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, hoặc 1% ái lực gắn kết với BASIGIN của người.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” chỉ mảnh kháng thể được tạo ra từ mảnh của kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR, hoặc phần kháng thể khác bất kỳ mà gắn kết với kháng nguyên nhưng không có cấu trúc kháng thể nguyên thể nguyên vẹn. Các ví dụ về mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, mảnh Fv, mảnh Fv được làm ổn định bằng disulfua (disulfide stabilized Fv fragment - dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, kháng thể kép (diabody - dAb), ds-kháng thể kép đặc hiệu kép (ds-dAb đặc hiệu kép), Fv đơn chuỗi (single-chain Fv - scFv), scFv dime, polypeptit gắn kết đơn chuỗi, CDR tách được và kháng thể đa đặc hiệu. Mảnh gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với cùng kháng nguyên mà kháng thể gốc gắn kết với.

“Fab” được dùng để chỉ mảnh gắn kết kháng nguyên hóa trị một của kháng thể được cấu thành từ một chuỗi nhẹ (cả vùng biến đổi và vùng ổn định) được gắn với vùng biến đổi và vùng ổn định thứ nhất của một chuỗi nặng bằng liên kết disulfua.

“Fab” được dùng để chỉ mảnh gắn kết kháng nguyên hóa trị một mà tương ứng với mảnh Fab còn chứa một phần của vùng bản lề.

“F(ab')<sub>2</sub>” được dùng để chỉ dime của hai mảnh Fab' mà được gắn với nhau bằng liên kết disulfua.

“Fv” được cấu thành từ vùng biến đổi của một chuỗi nhẹ được gắn với vùng biến đổi của một chuỗi nặng.

“dsFv” được dùng để chỉ mảnh Fv được ổn định bằng disulfua mà sự liên kết giữa vùng biến đổi của một chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của một chuỗi nặng là liên kết disulfua. Theo một số phương án, “(dsFv)<sub>2</sub>” bao gồm ba chuỗi peptit: hai gốc V<sub>H</sub> được liên kết bằng cầu nối peptit và được gắn bằng cầu nối disulfua với hai gốc V<sub>L</sub>. Theo

một số phương án, dsFv là đặc hiệu kép trong đó mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được ghép cặp bằng disulfua có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau.

“Kháng thể kép” hoặc “dAb” được dùng để chỉ các mảnh nhỏ có hai vị trí gắn kết kháng nguyên, trong đó các mảnh này chứa miền  $V_H$  được nối với miền  $V_L$  trong một chuỗi polypeptit ( $V_H-V_L$  hoặc  $V_L-V_H$ ) (xem, ví dụ, Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A.;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161), bằng cách sử dụng cầu nối mà quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền trên một chuỗi, các miền này bị buộc ghép cặp với các miền bổ sung của một chuỗi khác, nhờ đó tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên.

Theo một số phương án, “kháng thể kép ds đặc hiệu kép” chứa  $V_{H1}-V_{L2}$  (được liên kết bằng cầu nối peptit) được gắn với  $V_{L1}-V_{H2}$  (cũng được liên kết bằng cầu nối peptit) thông qua cầu nối disulfua giữa  $V_{H1}$  và  $V_{L1}$ .

“Fv đơn chuỗi” hoặc “scFv” hoặc “kháng thể đơn chuỗi” được dùng để chỉ các mảnh kháng thể được xử lý kỹ thuật chứa một miền  $V_H$  và một miền  $V_L$  của kháng thể, trong đó các miền này được nối với nhau một cách trực tiếp hoặc thông qua trình tự cầu nối peptit để tạo ra một chuỗi polypeptit (Huston JS et al., Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)).

“scFv dime” được dùng để chỉ dime của hai scFv.

“Polypeptit gắn kết đơn chuỗi” được dùng để chỉ polypeptit đơn chuỗi bất kỳ mà có khả năng gắn kết với kháng nguyên hoặc epitop.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng nguyên” được dùng để chỉ phân tử hoặc một phần của phân tử có khả năng được gắn kết bởi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, và còn có khả năng được sử dụng trong động vật để tạo ra các kháng thể có khả năng gắn kết với kháng nguyên đó. Kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitop. Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ nhóm nguyên tử đặc hiệu (ví dụ, mạch bên của đường, các nhóm phosphoryl, các nhóm sulfonyl) hoặc các axit amin trên kháng nguyên mà có khả năng tương tác với các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên.

Theo một số phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên là mảnh kháng thể được chọn từ Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dsFv, dAb, scFv, và polypeptit gắn kết đơn chuỗi.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng của chuột nhắt làm ví dụ HAb18GC2 (còn được gọi là 6H8), kháng thể khảm của nó (tức là c6H8), và các kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1, HP6H8-2, HP6H8-3.

Kháng thể đơn dòng của chuột nhắt HAb18GC2 có vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29. Kháng thể khảm c6H8 chứa vùng ổn định của người thuộc isotyp IgG1 được dung hợp với vùng biến đổi của chuột nhắt được nêu trên đây.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người được chọn từ nhóm bao gồm HP6H8-1, HP6H8-2 và HP6H8-3, mà lần lượt có vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, 5 và 7 (lần lượt tương ứng với các trình tự ADN mã hóa nêu trong SEQ ID NO: 4, 6 và 8) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16, 18 và 20 (lần lượt tương ứng với các trình tự ADN mã hóa nêu trong SEQ ID NO: 17, 19 và 21).

Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp. Quy trình tái tổ hợp sản xuất kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

1) Gây miễn dịch động vật không phải người thích hợp bằng protein BASIGIN của người hoặc tế bào sản sinh hBASIGIN. Động vật này có thể là chuột nhắt, chuột cống, cừu, dê, thỏ, hoặc chuột lang. Tạo tế bào lai sản sinh kháng thể bằng cách sử dụng lá lách hoặc hạch bạch huyết từ động vật không phải người, hoặc gom tế bào B của động vật không phải người đã được gây miễn dịch và đo nồng độ kháng thể kháng BASIGIN đơn dòng không phải của người. Phân lập và giải trình tự ADN mã hóa kháng thể đơn dòng này bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng

cách sử dụng các mẫu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

2) Tạo dòng các polynucleotit mã hóa kháng thể kháng BASIGIN đơn dòng không phải của người có nồng độ thích hợp từ tế bào lai được tạo ra hoặc các dòng vô tính tế bào B gom được. Phân tích trình tự của các polypeptit được mã hóa bởi các polynucleotit để nhận diện ranh giới CDR đối với các kháng thể đơn dòng không phải của người.

3) Thu gen tái tổ hợp của kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bằng cách ghép các gen CDR của kháng thể có nguồn gốc không phải của người vào trong gen của globulin miễn dịch của người, sao cho khung vùng biến đổi và các vùng ổn định là, nếu có, toàn bộ hoặc hầu hết từ các trình tự globulin miễn dịch của người.

4) Tùy ý kết hợp gen tái tổ hợp vào trong vector thích hợp, và đưa vector hoặc gen tái tổ hợp này vào trong các tế bào vật chủ để tạo ra kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này.

Kháng thể này và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này có thể thu được ở dạng gần như tinh khiết và đồng nhất bằng cách nuôi cấy các tế bào vật chủ, tiếp theo tách và tinh chế các tế bào vật chủ này hoặc dịch nuôi cấy (ví dụ, dịch nổi). Để tách và tinh chế kháng thể này hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, phương pháp thông thường bất kỳ để tinh chế polypeptit có thể được dùng.

#### Trình tự axit nucleic phân lập

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này.

Chất “được phân lập” là chất mà được biến đổi dưới bàn tay của con người từ trạng thái tự nhiên của nó, ví dụ, một chất có trong tự nhiên được lấy ra khỏi môi trường ban đầu của nó có thể được gọi là chất được phân lập. Axit nucleic “phân lập” là phân tử axit nucleic mà hầu như không chứa các phân tử axit nucleic khác, và không kết hợp với các thành phần có trong tự nhiên kèm theo axit nucleic này ở trạng thái nguyên thể. “Trình tự axit nucleic phân lập” được dùng để chỉ trình tự của phân tử axit nucleic phân lập.

Theo một số phương án, các trình tự axit nucleic phân lập bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit mã hóa các trình tự CDR được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic phân lập bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8, hoặc trình tự tương đồng của chúng. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic phân lập bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21, hoặc trình tự tương đồng của chúng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “thể tương đồng” và “tương đồng” được sử dụng thay thế được cho nhau và chỉ các trình tự axit nucleic (hoặc sợi bổ sung của nó) hoặc các trình tự axit amin mà có mức độ đồng nhất trình tự là ít nhất 80% (ví dụ, ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) so với các trình tự khác khi được bắt cặp một cách tối ưu.

Tỷ lệ phần trăm (%) “mức độ đồng nhất trình tự” đối với trình tự axit nucleic (hoặc trình tự axit amin) được xác định là tỷ lệ phần trăm các gốc axit nucleic (hoặc axit amin) trong trình tự dự tuyển mà giống với các gốc axit nucleic (hoặc axit amin) trong trình tự tham chiếu, sau khi bắt cặp các trình tự và, nếu cần, đưa các khoảng trống vào, để đạt được mức độ tương ứng lớn nhất. Sự bắt cặp nhằm các mục đích xác định tỷ lệ phần trăm mức độ đồng nhất trình tự axit nucleic (hoặc axit amin) có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng các công cụ có sẵn công khai như phần mềm BLASTN, BLASTp (có sẵn trên trang web của Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI) Hoa Kỳ, cũng xem, Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215:403–410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic

Acids Res., 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (có sẵn trên trang web của European Bioinformatics Institute, cũng xem, Higgins D.G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)), và ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng các thông số mặc định được cung cấp bởi công cụ này, hoặc có thể tùy biến các thông số dưới dạng thích hợp để bắt cặp như, ví dụ, bằng cách lựa chọn thuật toán thích hợp.

### Vector

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất vector chứa trình tự axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phương tiện mang axit nucleic có khả năng biến nạp hoặc chuyển nạp tế bào và cho phép sự biểu hiện gen trong tế bào. Vector có thể là vector biểu hiện hoặc vector tạo dòng. Sáng chế đề xuất các vector (ví dụ, vector biểu hiện) chứa trình tự axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ít nhất một trình tự khởi động (ví dụ, SV40, CMV, EF-1 $\alpha$ ) được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic này, và ít nhất một gen đánh dấu chọn lọc. Các vector biểu hiện theo sáng chế có thể là các vector virus, các plasmit, các thể thực khuẩn và các cosmid. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, retrovirus (kể cả lentivirus), adenovirus, virus kết hợp adeno, virus ecpet (ví dụ, virus herpes simplex), poxvirus, baculovirus, virus gây u nhú, papovavirus (ví dụ, SV40), thể thực khuẩn lamda, và thể thực khuẩn M13, plasmit pcDNA3.3, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pcDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos v.v..

### Tế bào vật chủ

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ chứa vector được đề xuất trong bản mô tả này.

“Tế bào vật chủ” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ tế bào mà axit nucleic ngoại sinh và/hoặc vector đã được đưa vào nó để biểu hiện một hoặc nhiều protein ngoại sinh. Thuật ngữ “tế bào vật chủ” dự định để chỉ cả tế bào đối tượng cụ thể và con cháu của nó. Tế bào vật chủ có thể là sinh vật chưa có nhân điển hình, sinh vật có nhân điển hình, tế bào thực vật, tế bào động vật hoặc tế bào lai. Các tế bào vật chủ khác nhau có thể có các đặc điểm và cơ chế khác nhau để xử lý sau dịch mã và cải biến các protein và các sản phẩm gen, do đó, các dòng tế bào thích hợp có thể được chọn làm tế bào vật chủ để bảo đảm sự cải biến chính xác và xử lý (như sản phẩm phiên mã chủ yếu, sự glycosyl hóa, và sự phosphoryl hóa) kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được biểu hiện. Theo một số phương án, các tế bào vật chủ là các tế bào của động vật có vú.

Các ví dụ về các dòng tế bào vật chủ hữu ích của động vật có vú là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (ví dụ, COS-7); dòng thận phôi của người (ví dụ, các tế bào 293 hoặc 293T được tách dòng phụ để sinh trưởng trong môi trường huyền phù nuôi cấy); các tế bào thận của chuột hamster mới đẻ (BHK, ATCC CCL 10); các tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (ví dụ, CHO/-DHFR, CHO/-GS, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:116 (1980)); tế bào sertoli của chuột nhắt (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); các tế bào thận khỉ (CV1 ATCC CCL 70); các tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587); các tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA, ATCC CCL 2); các tế bào thận loài chó (MDCK, ATCC CCL 34); các tế bào gan chuột cống (BRL 3A, ATCC CRL 141); các tế bào phổi của người (W138, ATCC CCL 75); các tế bào caxinom tế bào gan của người (Hep G2, HB 8065); khối u vú của chuột nhắt (MMT 060562, ATCC CCL51); các tế bào TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); các tế bào MRC 5; các tế bào FS4; PC12; dòng tế bào nguyên bào sợi phôi của chuột nhắt (3T3); các tế bào u tủy NSO (dòng tế bào u tủy của chuột mà không sản sinh nội sinh chuỗi



globulin miễn dịch chức năng bất kỳ). Theo một số phương án, các tế bào vật chủ là các tế bào CHO.

Các tế bào vật chủ đã được biến nạp bằng các vector hoặc các gen tái tổ hợp được mô tả trên đây có thể được nuôi cấy trong môi trường chất dinh dưỡng thông thường, hoặc môi trường chất dinh dưỡng thông thường được cải biến thích hợp để cảm ứng trình tự khởi động, lựa chọn thể biến nạp, hoặc khuếch đại các gen mã hóa các trình tự mong muốn. Theo một số phương án, các tế bào vật chủ có thể được đồng biến nạp bằng polynucleotit thứ hai mã hóa một mảnh khác của kháng thể. Theo một số phương án, các tế bào vật chủ có thể chứa axit nucleic ngoại sinh nhưng không biểu hiện protein được mã hóa bởi axit nucleic ngoại sinh này ở mức độ mong muốn trừ khi một chất điều hòa được đưa vào các tế bào hoặc một trình tự điều hòa được đưa vào các tế bào sao cho nó được liên kết hoạt động với axit nucleic. Theo một số phương án, các tế bào vật chủ chứa các vector đã được biến nạp có thể biểu hiện kháng thể kháng BASIGIN một cách tạm thời.

#### Dược phẩm

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này.

Dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này có thể ở dạng thông thường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch lỏng, huyền phù, nhũ tương, viên tròn, viên nang, viên nén, sản phẩm giải phóng kéo dài hoặc bột. Theo một số phương án, dược phẩm này được bào chế thành chế phẩm để tiêm. Các ví dụ về chế phẩm để tiêm bao gồm các dung dịch vô trùng sẵn sàng để tiêm; huyền phù vô trùng sẵn sàng để tiêm; nhũ tương vô trùng sẵn sàng để tiêm; sản phẩm khô hòa tan được vô trùng, như bột đông khô, sẵn sàng để được hoàn nguyên trong dung môi ngay trước khi sử dụng và các dạng tương tự như vậy. Bột đông khô có thể được bảo quản trong các điều kiện thích hợp như ở khoảng 4°C đến nhiệt độ trong phòng. Các dung dịch hữu ích để hoàn nguyên có thể là dung dịch nước hoặc không

phải nước. Theo một số phương án, chế phẩm để tiêm liều đơn vị được bao gói trước trong ống thuốc tiêm, lọ hoặc bơm tiêm có kèm kim. Theo một số phương án, chế phẩm để tiêm nhiều liều được bao gói trước trong ống thuốc tiêm hoặc lọ.

Theo một số phương án, dược phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.

Thuật ngữ “dược dụng” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là chất mang dược chỉ định nói chung tương hợp về mặt hóa học và/hoặc vật lý với các thành phần khác được chứa trong dược phẩm, và trong phạm vi đánh giá y học đúng đắn, thích hợp để sử dụng in vivo cho đối tượng nhận (ví dụ, người và các động vật) mà không có độc tính, sự kích ứng, đáp ứng dị ứng, hoặc vấn đề hoặc biến chứng khác quá mức, tương ứng với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý.

“Chất mang dược dụng” có thể bao gồm, ví dụ, chất dẫn dạng nước, không phải nước hoặc dạng rắn dược dụng, chất kháng vi sinh vật, chất đẳng trương, chất đệm, chất điều chỉnh độ pH, chất tạo huyền phù/chất phân tán, chất tạo phức hoặc chất tạo chelat, chất pha loãng, tá chất, tá dược, hoặc chất hỗ trợ không độc, các thành phần khác đã biết trong lĩnh vực này, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng, mà có thể tạo thuận lợi cho việc bảo quản và dùng các hoạt chất cho đối tượng. Các chất mang dược dụng mà có thể được dùng trong sáng chế bao gồm các chất nói chung đã biết trong lĩnh vực này, như các chất được mô tả trong “Remington Pharmaceutical Sciences” Mack Pub. Co., New Jersey (1991), mà được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Để minh họa thêm, các chất mang dược dụng có thể bao gồm, ví dụ, nước vô trùng, natri clorua, dextroza, lactoza, fructoza, glucoza, trehaloza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, rượu etylic, polyetylen glycol, propylen glycol, phenol, cresol, rượu benzylic, clo-butanol, glyxerol, prolin, histidin, arginin, axit clohydric, axit axetic, axit xitric, axit lactic, axit succinic, axit ascorbic, axetat, xitrat, axit succinic xitrat, phosphat, sorbitat, sucroza phosphat, natri succinat, natri xitrat, etanol natri axetat, natri hydroxit, metyl và este của axit propyl p-hydroxybenzoic, thimerosal, benzalkoni clorua, benzethoni clorua, sorbitan monolaurat, trietanolin oleat, xyclodextrin, TWEEN-20, Tween-80, xirô ngô, glyxerin, natri bisulfat, procain hydroclorua,

Poloxam, natri carboxymetylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, polyvinyl pyrrolidon, EDTA, EGTA hoặc chất thích hợp khác.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này, và một hoặc nhiều chất trị liệu khác. Theo một số phương án, chất trị liệu khác này là chất được sử dụng trong xạ trị, hóa trị liệu, trị liệu đích, trị liệu bằng gen, trị liệu miễn dịch, trị liệu bằng hormone, ức chế sự tạo mạch, chăm sóc làm giảm nhẹ, phẫu thuật, thuốc chống sốt rét hoặc kết hợp của chúng.

### Kit

Sáng chế đề xuất kit chứa các kháng thể kháng BASIGIN hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kit này hữu ích để phát hiện sự có mặt hoặc hàm lượng của BASIGIN trong mẫu sinh học. Mẫu sinh học có thể là các tế bào hoặc mô.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chứa trong kit được tiếp hợp với chất đánh dấu để phát hiện (ví dụ, chất đánh dấu huỳnh quang, phóng xạ hoặc enzym). Theo một số phương án khác, kit này chứa kháng thể kháng BASIGIN hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó không được đánh dấu và còn chứa kháng thể được đánh dấu thứ hai mà có khả năng gắn kết với kháng thể kháng BASIGIN không được đánh dấu. Kit này có thể còn chứa phương tiện phát hiện chất đánh dấu. Kit này có thể chứa chất phản ứng và chất đệm bổ sung được dùng để thực hiện phương pháp cụ thể. Kit này có thể còn chứa hướng dẫn sử dụng, và bao gói mà tách mỗi trong số các thành phần trong kit. Theo một số phương án, kit này chứa thử nghiệm miễn dịch để phát hiện kháng thể BASIGIN.

Theo một số phương án, kit này được đề xuất để phát hiện hàm lượng protein BASIGIN. Theo một số phương án, kit này được dùng để dự đoán, chẩn đoán, phòng ngừa hoặc điều trị các tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN.

### Phương pháp điều trị

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN ở đối tượng, mà bao gồm việc cho đối tượng này dùng được phẩm được đề xuất trong bản mô tả này với lượng có hiệu quả.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong bản mô tả này để bào chế thuốc dùng để điều trị tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN ở đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế hữu ích để điều trị tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN ở đối tượng.

Thuật ngữ "đối tượng" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ động vật. Thông thường, động vật này là động vật có vú, ví dụ cụ thể bao gồm động vật linh trưởng (ví dụ, người), chó, mèo, ngựa, bò, lợn, và cừu. Theo một số phương án, đối tượng này là người.

“Tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh bất kỳ mà được gây ra bởi, được làm trầm trọng bởi, hoặc nếu không được liên kết với mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính tăng hoặc giảm của BASIGIN (ví dụ, BASIGIN của người). Theo một số phương án, tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN là bệnh ung thư, bệnh viêm hoặc bệnh lây nhiễm.

“Bệnh ung thư” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh bất kỳ được đặc trưng bởi sự phát triển tế bào hoặc khối u ác tính, sự tăng sinh bất thường, sự thâm nhiễm hoặc sự di căn, và bao gồm cả khối u rắn và ung thư không rắn (bệnh máu ác tính) như bệnh bạch cầu. Khi được sử dụng trong bản mô tả này “khối u rắn” chỉ khối rắn của các tế bào ung thư và/hoặc ác tính. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (hình vảy/không hình vảy), bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư vú (kể cả caxinom vú tế bào đáy, caxinom ống tuyến và caxinom vú tiểu thùy),

bệnh ung thư tuyến tụy, caxinom dạ dày, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thực quản, u trung biểu mô, u melanin, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến giáp, sacom, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp, bệnh ung thư cổ tử cung, caxinom tuyến ức, u melanin, u tủy, u sùi dạng nấm, bệnh ung thư tế bào merkel, caxinom tế bào gan (hepatocellular carcinoma - HCC), sacom sợi, sacom niêm, sacom mỡ, sacom sụn, sacom mô tạo xương, và các sacom khác, u màng hoạt dịch, u trung biểu mô, u Ewing, sacom cơ trơn, sacom cơ vân, khối u limphô ác tính, caxinom tế bào đáy, caxinom tuyến, caxinom tuyến mồ hôi, caxinom tuyến giáp thể tủy, caxinom tuyến giáp thể nhú, u tế bào ưa crom, caxinom tuyến bã nhờn, caxinom thể nhú, caxinom tuyến thể nhú, caxinom thể tủy, caxinom bắt nguồn từ phế quản, u gan, caxinom ống dẫn mật, caxinom dạ con, u Wilms, bệnh ung thư cổ tử cung, u tinh hoàn, u tinh, u limphô Hodgkin kinh điển (classical Hodgkin lymphoma - CHL), u limphô tế bào B lớn trung thất nguyên phát, u limphô tế bào T/tế bào B giàu mô bào, bệnh bạch cầu limphô cấp, bệnh bạch cầu tủy cấp, bệnh bạch cầu tạo nên ở tủy xương cấp tính, bệnh bạch cầu tủy bào (bạch cầu hạt) mạn tính, bệnh bạch cầu tủy mạn tính, bệnh bạch cầu limphô mạn tính, bệnh đa hồng cầu nguyên phát, khối u có nguồn gốc từ dưỡng bào, PTLĐ dương tính và âm tính với EBV, và u limphô tế bào B lớn lan tỏa (diffuse large B-cell lymphoma - DLBCL), u limphô nguyên tương bào, u limphô tế bào NK/tế bào T ngoài hạch, caxinom mũi-họng, u limphô lan tỏa nguyên phát liên quan đến HHV8, u limphô không Hodgkin, bệnh đa u tủy, macroglobulin huyết Waldenstrom, bệnh chuỗi nặng, hội chứng loạn sản tủy, bệnh bạch cầu tế bào lông và bệnh loạn sản tủy, u limphô CNS nguyên phát, u cột sống, u thần kinh đệm thân não, u tế bào hình sao, u nguyên bào tủy, u sọ hầu, u màng não thất, u tuyến tủy, u nguyên bào mạch máu, u dây thanh quản, u tế bào thần kinh đệm ít gai, u màng não, u melanin, u nguyên bào thần kinh và u nguyên bào võng mạc. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư di căn, đặc biệt là bệnh ung thư di căn biểu hiện BASIGIN.

Theo một số phương án, các tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN là các bệnh viêm như bệnh luput ban đỏ toàn thân (systemic lupus erythematosus - SLE), chứng viêm niêm mạc ruột, bệnh hao mòn liên quan đến bệnh viêm kết tràng, bệnh đa

xơ cứng, bệnh nhiễm virus, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh Cohn, và bệnh viêm ruột, bệnh vẩy nến, bệnh cứng bì toàn thân, bệnh đái tháo đường tự miễn và các bệnh tương tự.

Theo một số phương án, các tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN là bệnh lây nhiễm như bệnh nhiễm nấm, bệnh nhiễm ký sinh trùng/động vật nguyên sinh hoặc bệnh nhiễm virus mạn tính, ví dụ, bệnh sốt rét, bệnh nấm *coccidioides immitis*, bệnh nấm *Histoplasma*, bệnh nấm móng, bệnh nấm *Aspergillus*, bệnh nấm *blatomyces*, bệnh nấm *candida albicans*, bệnh nấm *paracoccidioides*, bệnh nhiễm vi bào tử trùng, bệnh viêm giác mạc do *Acanthamoeba keratitis*, bệnh do amip gây ra, bệnh giun đũa, bệnh nhiễm *babesia*, bệnh *Balantidium*, bệnh nhiễm giun tròn *Baylisascaris*, bệnh Chagas, bệnh sán lá gan nhỏ, bệnh nhiễm *Cochliomyia*, bệnh nhiễm *Cryptosporidium*, bệnh sán *Diphyllobothrium*, bệnh giun *dracunculus*, bệnh sán *Echinococcus*, bệnh chân voi, bệnh giun kim, bệnh sán lá, bệnh sán *Fasciolopsis*, bệnh giun chỉ, bệnh nhiễm khuẩn *giardiasis*, bệnh giun *gnathostoma*, bệnh sán *hymenolepsis*, bệnh nhiễm *Isospora*, bệnh sốt Katayama, bệnh *Leishmania*, bệnh Lyme, bệnh giun *metagonimus*, bệnh dòi, bệnh giun chỉ u, bệnh chấy rận, bệnh ghẻ, bệnh sán máng, bệnh ngủ, bệnh giun lươn, tình trạng nhiễm sán, bệnh *toxocara*, bệnh nhiễm *Toxoplasma*, bệnh giun xoắn, bệnh giun tóc, bệnh *trypanosoma*, bệnh nhiễm giun sán, bệnh nhiễm virus viêm gan B (HBV), virus viêm gan C (HCV), virus ecpet, virus Epstein-Barr, HIV, virus cự bào, virus herpes simplex typ I, virus herpes simplex typ II, virus gây u nhú ở người, adenovirus, virus gây suy giảm miễn dịch ở người I, virus gây suy giảm miễn dịch ở người II, dịch virus ecpet liên quan đến Kaposi West sacom, virus vòng mảnh (virus Torque teno), virus hướng tế bào limphô T ở người I, virus hướng tế bào limphô T ở người II, virus varicella zoster, virus JC hoặc virus BK. Theo một số phương án, tình trạng bệnh này là bệnh sốt rét.

“Việc điều trị”, “điều trị” hoặc “trị liệu” tình trạng bệnh được sử dụng trong bản mô tả này có thể được sử dụng thay thế nhau, và bao gồm các biện pháp điều trị trị liệu, phòng bệnh hoặc ngăn ngừa như ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm tình trạng bệnh, làm chậm sự khởi phát hoặc tốc độ phát triển của tình trạng bệnh, làm giảm

nguy cơ phát triển tình trạng bệnh, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự phát triển của các triệu chứng liên quan đến tình trạng bệnh, làm giảm hoặc làm hết các triệu chứng liên quan đến tình trạng bệnh, tạo ra sự thoái triển hoàn toàn hoặc một phần của tình trạng bệnh, chữa trị tình trạng bệnh, hoặc một số kết hợp của chúng.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị bệnh” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ liều lượng hoặc nồng độ của dược chất có hiệu quả để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến BASIGIN của người. Ví dụ, về việc sử dụng kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này để điều trị bệnh ung thư, lượng có hiệu quả điều trị bệnh là liều lượng hoặc nồng độ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có khả năng làm giảm thể tích khối u, ức chế sự sinh trưởng hoặc sự tăng sinh của các tế bào ung thư, ức chế hoặc làm chậm sự sinh trưởng khối u hoặc sự thâm nhiễm tế bào ung thư vào trong các cơ quan khác, ức chế hoặc làm chậm sự di căn tế bào ung thư, cải thiện triệu chứng bất kỳ liên quan đến ung thư, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh ung thư, hoặc một số kết hợp của chúng. Hoặc, về việc sử dụng kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này để điều trị bệnh sốt rét, lượng có hiệu quả điều trị bệnh là liều lượng hoặc nồng độ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có khả năng ức chế bệnh nhiễm trùng hoặc sự tăng sinh của plasmodium, cải thiện triệu chứng bất kỳ liên quan đến tình trạng sốt rét, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự phát triển của tình trạng sốt rét, hoặc một số kết hợp của chúng.

Lượng có hiệu quả điều trị bệnh (khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các chất khác như tác nhân hóa trị liệu) của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên như được đề xuất trong bản mô tả này sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, loại bệnh cần điều trị, loại kháng thể, thể trọng, tuổi, tiền sử bệnh, các thuốc đang dùng, tình trạng sức khỏe của đối tượng, tình trạng miễn dịch và khả năng phản ứng chéo, khả năng dị ứng, miễn cảm và các tác dụng phụ bất lợi, cũng như đường dùng và loại, mức độ nghiêm trọng và sự phát triển của bệnh và chủ ý của bác sĩ hoặc bác sĩ thú y.

Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên như được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng ở liều có hiệu quả điều trị bệnh nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 100 mg/kg một hoặc nhiều lần mỗi ngày (ví dụ, khoảng 0,01 mg/kg, khoảng 0,3 mg/kg, khoảng 0,5 mg/kg, khoảng 1 mg/kg, khoảng 3 mg/kg, khoảng 5 mg/kg, khoảng 10 mg/kg, khoảng 15 mg/kg, khoảng 20 mg/kg, khoảng 25 mg/kg, khoảng 30 mg/kg, khoảng 35 mg/kg, khoảng 40 mg/kg, khoảng 45 mg/kg, khoảng 50 mg/kg, khoảng 55 mg/kg, khoảng 60 mg/kg, khoảng 65 mg/kg, khoảng 70 mg/kg, khoảng 75 mg/kg, khoảng 80 mg/kg, khoảng 85 mg/kg, khoảng 90 mg/kg, khoảng 95 mg/kg, hoặc khoảng 100 mg/kg một hoặc nhiều lần mỗi ngày). Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được dùng ở liều khoảng 50 mg/kg hoặc nhỏ hơn, và theo một số phương án, liều này là 20 mg/kg hoặc nhỏ hơn, 10 mg/kg hoặc nhỏ hơn, 3 mg/kg hoặc nhỏ hơn, 1 mg/kg hoặc nhỏ hơn, 0,3 mg/kg hoặc nhỏ hơn, hoặc 0,1 mg/kg hoặc nhỏ hơn. Theo một số phương án, liều dùng có thể thay đổi theo tiến trình điều trị. Ví dụ, theo một số phương án, liều dùng ban đầu có thể cao hơn so với các liều dùng tiếp theo. Theo một số phương án, liều dùng có thể thay đổi theo tiến trình điều trị phụ thuộc vào phản ứng của đối tượng.

Chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng trị liệu). Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên như được đề xuất trong bản mô tả này được dùng cho đối tượng ở một thời điểm hoặc trong một đợt điều trị. Theo một số phương án, kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên như được đề xuất trong bản mô tả này được dùng cho đối tượng theo một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Hướng dẫn có thể được tìm thấy trong, ví dụ, patent Mỹ số 4,657,760; 5,206,344; 5,225,212.

Các kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người và các mảnh gắn kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dùng theo đường



bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, đường ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, tiêm dưới da, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, kể cả truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, hoặc trong da) hoặc đường không phải ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dùng qua đường miệng, trong mũi, trong mắt, dưới lưỡi, trực tràng, hoặc tại chỗ).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người và các mảnh gắn kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dùng theo cách giải phóng có kiểm soát. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa giải phóng có kiểm soát có thể được bào chế dưới dạng cấy dưới da, thuốc tiêm dạng dầu hoặc hệ hạt phân tán (ví dụ, vi cầu, vi hạt, vi nang, nang nano, hạt cầu nano, và hạt nano) (xem Banga, A. J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995); Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 219-31 (1994); Tice & Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y., pp. 315-339, (1992)). Theo một số phương án, các kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người và các mảnh gắn kết kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng trong các nền polyme dễ bị phân hủy hoặc không bị phân hủy (xem Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537-51, 1993).

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các dạng số ít “một” (“a”, “an” and “the” trong bản mô tả tiếng Anh) được dự định còn bao gồm cả dạng số nhiều, trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ khác. Còn sẽ được hiểu rằng các thuật ngữ “bao gồm”, “gồm”, “gồm có”, “kể cả”, “có” và/hoặc “có” nếu được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ rõ sự có mặt của các dấu hiệu, các bước, các thao tác, các yếu tố và/hoặc các thành phần đã định, nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc bổ sung của một hoặc nhiều dấu hiệu, bước, thao tác, yếu tố, thành phần và/hoặc nhóm khác của chúng. Khi được sử dụng trong

bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng," khi được viện dẫn đến trị số được nêu cụ thể, có nghĩa là trị số này có thể thay đổi từ trị số được nêu trong khoảng không quá 10%.

Mọi tài liệu được trích dẫn trong bản mô tả này, kể cả patent hoặc đơn được viện dẫn chéo hoặc liên quan bất kỳ được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ trừ khi bị tuyệt đối loại trừ hoặc bị giới hạn khác. Việc trích dẫn tài liệu bất kỳ không phải là thừa nhận rằng nó là giải pháp kỹ thuật đã biết đối với sáng chế bất kỳ được bộc lộ hoặc được bảo hộ trong bản mô tả này hoặc nó riêng rẽ, hoặc kết hợp bất kỳ với tài liệu hoặc các tài liệu khác bất kỳ, hướng dẫn, gợi ý hoặc bộc lộ sáng chế bất kỳ này. Hơn nữa, ở phạm vi mà ý nghĩa hoặc định nghĩa bất kỳ của một thuật ngữ trong bản mô tả này mâu thuẫn với ý nghĩa hoặc định nghĩa bất kỳ của cùng thuật ngữ trong tài liệu được đưa vào bằng cách viện dẫn, thì ý nghĩa hoặc định nghĩa được gán cho thuật ngữ đó trong bản mô tả này sẽ chi phối.

#### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các ví dụ sau được đưa ra để minh họa thêm sáng chế và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các chế phẩm, nguyên liệu, và phương pháp cụ thể được mô tả dưới đây, nguyên vẹn hoặc một phần, là thuộc phạm vi của sáng chế. Các chế phẩm, nguyên liệu, và phương pháp cụ thể này không được dự định giới hạn sáng chế, mà chỉ để minh họa các phương án cụ thể thuộc phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể phát triển các chế phẩm, nguyên liệu, và phương pháp tương đương mà không cần rèn luyện khả năng sáng tạo và không vượt quá phạm vi của sáng chế. Cần phải hiểu rằng nhiều biến đổi có thể được thực hiện trong các quy trình được mô tả trong bản mô tả này trong khi vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế. Dự định của các tác giả sáng chế là các biến đổi này được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

#### **Ví dụ 1: Tạo cấu trúc vector hiển thị trên thể thực khuẩn**

Dòng tế bào lai HAb18GC2 được tạo ra và được lưu giữ ở Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection) vào năm 2006, với số hiệu lưu giữ là CCTCC-C200636. Thông tin chi tiết về dòng tế bào,

kháng thể được sản sinh bởi dòng tế bào này và phương pháp điều chế được mô tả trong patent Trung Quốc ZL200710007452.2, mà được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

ARN toàn phần được chiết từ tế bào lai HAb18GC2 bằng cách sử dụng kit chiết ARN toàn phần (Omega bio-tek) theo hướng dẫn của kit. Trạng thái nguyên vẹn của ARN toàn phần chiết được được phân tích bằng cách điện di trên gel agarosa.

ADN bổ trợ được điều chế bằng cách lấy 1µg ARN toàn phần, tổng hợp sợi thứ nhất của ADN bổ trợ theo hướng dẫn của kit phiên mã ngược PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho các thử nghiệm tiếp theo.

Các mảnh gen VH và các mảnh gen VL được khuếch đại từ khuôn mẫu ADN bổ trợ bằng cách lần lượt sử dụng các bộ đoạn môi đặc hiệu với gen VH và VL trong phản ứng PCR. ADN polymeraza có độ tin cậy cao Phusion® (NEB) được sử dụng trong PCR, và hỗn hợp phản ứng được điều chế theo hướng dẫn của NEB. Điều kiện phản ứng PCR được thiết đặt như sau: 94°C, 5 phút; (94°C, 15 giây, 54°C, 30 giây, 72°C, 1 phút) x 35 chu kỳ; 72°C, 10 phút. Kích thước của các mảnh đã được khuếch đại được xác định trong quá trình điện di trên gel agarosa 1%.

Trình tự cầu nối và trình tự bổ sung ngược của nó lần lượt được đưa vào đầu 3' của mảnh gen VH và đầu 5' của mảnh gen VL thông qua các đoạn môi (cầu nối ngược VH-R1: SEQ ID NO: 34, CAAAGTTGGAAATAAAAGCGGCCGCAGAACAAAA; cầu nối VL-F1: SEQ ID NO: 35, TTTTGTCTGCGGCCGCTTTTATTTCCAACCTTTG) trong phản ứng PCR tiếp.

Mảnh gen VH và mảnh gen VL có trình tự cầu nối hoặc trình tự bổ sung ngược của trình tự cầu nối được trộn theo tỷ lệ 1:1 (mol/mol) và gen scFv được khuếch đại bằng cách sử dụng phương pháp PCR gộp nhau. Hệ phản ứng được chuẩn bị như sau: 1 pmol mảnh gen VH, 1 pmol mảnh gen VL, 100 pmol đoạn môi pFL-6H8-F1 (SEQ ID NO: 33 CCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGAAGCTTGAGGAGTCT), 100 pmol đoạn môi pFL-6H8-R2 (SEQ ID NO: 36 TTTTGTCTGCGGCCGCTTTTATTTCCAACCTTTG), 10 µl 10x dung dịch đệm

PCR. Điều kiện phản ứng PCR được thiết đặt như sau: 95°C, 5 phút; (95°C, 15 giây, 56°C, 30 giây, 72°C, 1 phút) x 35 chu kỳ; 72°C, 10 phút. Kích thước của mảnh đã được khuếch đại được xác định trong quá trình điện di trên gel agarosa 1%.

Dải ở kích thước kỳ vọng được cắt ra, và được thu bằng cách sử dụng kit tinh chế mảnh ADN (Omega bio-tek) để thu được mảnh gen scFv chứa các vị trí cắt giới hạn là Nco I và Not I.

Mảnh gen scFv chứa vị trí phân cắt Nco I và Not I và vector plasmit vector pGEM-T (Promega) được đo bằng máy đo quang phổ cực tím, và sau đó, được đem phân cắt bằng enzym giới hạn.

Phản ứng này được thiết đặt như sau: trộn 3µg mảnh gen scFv thu được hoặc 3µg vector pGEM-T, 1µl Nco I-HF, 1µl Not I-HF các endonucleaza giới hạn (restriction endonuclease - NEB), 5µl 10x dung dịch đệm CutSmart, và bổ sung nước đến 50 µl. Hỗn hợp phản ứng phân cắt được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Kích thước của các sản phẩm thu được được xác định trong quá trình điện di trên gel agarosa 1%, và dải ở kích thước kỳ vọng được cắt ra, và được thu bằng cách sử dụng kit tinh chế mảnh ADN (Omega bio-tek) để thu được mảnh gen scFv đã được phân cắt và vector pGEM-T đã được phân cắt.

Sau khi phân cắt, mảnh gen scFv và vector pGEM-T thu được được nối. Hỗn hợp phản ứng nối được thiết đặt như sau: 0,7 µg mảnh gen scFv đã được phân cắt, 1,4 µg vector pGEM-T đã được phân cắt, 40 U T4 ligaza, 40 µl 5x dung dịch đệm nối. Hỗn hợp phản ứng nối được ủ ở nhiệt độ 16°C qua đêm. Các tế bào có đủ khả năng TG1 được biến nạp bằng sản phẩm nối, sau đó, được rải trên các đĩa thạch LB và được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Các khuẩn lạc riêng rẽ được lựa chọn và được sàng lọc các dòng vô tính tích cực bằng đoạn môi vụn năng đối với vector. Các dòng vô tính tích cực sau đó được giải trình tự đối với đoạn xen chính xác, và các dòng được chứng minh là chứa đoạn xen chính xác (được gọi là plasmit tái tổ hợp pFL-6H8) được bảo quản ở nhiệt độ -40°C để sử dụng tiếp. Plasmit tái tổ hợp pFL-6H8 chứa gen scFv có các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ.

Ví dụ 2: Xác định các CDR và FR của kháng thể đơn dòng 6H8 của chuột nhắt

Các CDR trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể kháng hBASIGIN đơn dòng của chuột nhắt 6H8 (còn được gọi là HAb18GC2, xem patent Trung Quốc: ZL200710007452.2) được xác định theo cơ sở dữ liệu Kabat. Các trình tự axit amin của ba CDR của chuỗi nhẹ lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 trong phần danh mục trình tự. Các trình tự axit amin của ba CDR của chuỗi nặng lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11 trong phần danh mục trình tự.

Ví dụ 3: Lựa chọn các trình tự khung globulin miễn dịch của người thích hợp

Các trình tự FR của người thu được từ cơ sở dữ liệu Kabat được ghép với các CDR nêu trên để làm cho kháng thể này giống như của người và các vùng biến đổi của kháng thể ghép được sàng lọc về mức độ tương đồng và cấu trúc. Phần mềm máy tính có tên Discovery Vision (VIOVIA, phiên bản 3.5) được sử dụng để phân tích cấu trúc phân tử của kháng thể trước và sau khi làm giống như của người thông qua mô hình hóa phân tử, mô hình hóa mức độ tương đồng và sự tối ưu hóa cơ học, và để kiểm tra các biến đổi có thể trong các FR của người để bảo đảm rằng các FR được thay thế không làm thay đổi toàn bộ cấu trúc khung của VH và VL, đặc biệt là không phá hủy cấu trúc bậc hai của sợi  $\beta$  của kháng thể đơn dòng của chuột nhắt nhờ đó duy trì hoặc cải thiện ái lực của kháng thể ban đầu của chuột nhắt. Các trình tự FR biến đổi của chuỗi nặng/nhẹ của người được chọn có các biến đổi có thể ở các vị trí đặc hiệu được liệt kê song song với các trình tự FR của chuột nhắt trên Fig.1 và Fig.2 của sáng chế.

Ví dụ 4: Tạo cấu trúc và sàng lọc thư viện kháng thể kháng hBASIGIN được làm giống như của người hiển thị trên thể thực khuẩn

Dựa trên các trình tự của các CDR xác định được trong ví dụ 2 và các trình tự FR được kiểm tra trong ví dụ 3, trình tự nucleotit tương ứng mã hóa mảnh ScFv của kháng thể được làm giống như của người được thu bằng cách sử dụng các codon thường được sử dụng trong các tế bào của động vật có vú. Gen mã hóa được thu bằng

phương pháp PCR gộp nhau, sau đó, được tách dòng vào trong vector tạo dòng và được khuếch đại, và các dòng vô tính tích cực được đem phân tích giải trình tự. Việc làm giống như của người của các FR được thực hiện bằng cách đưa các thay đổi và các biến đổi vào ở các vị trí axit amin cụ thể trong trình tự mã hóa của các FR của chuỗi nặng/nhẹ bằng các đoạn môi. Quy trình chi tiết được mô tả dưới đây.

### Nguyên liệu

Mảnh scFv có nguồn gốc từ chuột nhất từ ví dụ 1 được sử dụng làm khuôn mẫu. Các đoạn môi sau được sử dụng để khuếch đại vùng biến đổi của chuỗi nặng được làm giống như của người (hVH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được làm giống như của người (hVL):

Các đoạn môi xuôi của hVH bao gồm:

1) 6H8-L1-F1: SEQ ID NO: 37

CAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGCTTGTGGAGTCTG

2) 6H8-L1-F2: SEQ ID NO: 38 (6H8-L1-F2 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó R = G hoặc A, S = G hoặc C)

CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTGAGTGGGTTRSCGAAATTAGAT  
TGAAATC

3) 6H8-L1-F3: SEQ ID NO: 39 (6H8-L1-F3 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó R = G hoặc A)

CAGATGAACTCCTTAARGACTGAAGACACTGCCGTGTATTACTGTAC  
CAG

Các đoạn môi ngược của hVH bao gồm:

1) 6H8-L1-R1: SEQ ID NO: 40 (6H8-L1-R1 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó M = A hoặc C, Y = T hoặc C)

GAAAGTGAATCCAGAGGCGMACAGGAGAGCYTCAGGGATCCTCC  
AGG

2) 6H8-L1\_R2: SEQ ID NO: 41

CCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGTTCATCCAGAAGTTACTGAAAGTG  
AATCCAG

3) 6H8-L1-R3: SEQ ID NO: 42 (6H8-L1-R3 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó R = G hoặc A, K = G hoặc T)

TAAGGAGTTCATCTGCAGGTACAGGRTGKTTTTGGAATCATCTCTTG

4) 6H8-L1-R4: SEQ ID NO: 43

GGGAGATTGGGTCATCTGAATGTCGCTAGCACCGCCAC

5) 6H8-L1\_R5: SEQ ID NO: 44 (6H8-L1\_R5 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó R = G hoặc A, S = G hoặc C, W = A hoặc T, V = G hoặc C hoặc A)

GGTGACCCTGTCGCCCCACTGAGRSGGACAGGGWGGVGGGAGATTG  
GGTC

Các đoạn môi xuôi của hVL bao gồm:

1) 6H8-L1\_F4: SEQ ID NO: 45 (6H8-L1\_F4 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó M = A hoặc C, W = A hoặc T)

GTGGGCGACAGGGTCACCMTCWCCTGCAAGGCCAGTGAG

2) 6H8-L1\_F6: SEQ ID NO: 46 (6H8-L1\_F6 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó Y = T hoặc C, S = G hoặc C, W = A hoặc T)

TCAGCAGTCTGCAGYCCGASGACWTCGCAACCTATTACTGTGGACA  
GAGTTAC

3) 6H8-L1\_F5: SEQ ID NO: 47

CCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTG  
CAG

Các đoạn môi ngược của hVL bao gồm:

1) 6H8-L1\_R6: SEQ ID NO: 48 (6H8-L1\_R6 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó H = A hoặc C hoặc T, K = G hoặc T)

GTTGGATGCCCCGTATATCAGCAGTTTAGGGGHCTKGCCTGGTTTCT  
GTTG

2) 6H8-L1\_R8: SEQ ID NO: 49

TTTGTTCTGCGGCCGCTTTTATTTCCAACCTTTGTCCC

3) 6H8-L1\_R7: SEQ ID NO: 50 (đoạn môi 6H8-L1\_R7 là hỗn hợp các đoạn môi, trong đó W = A hoặc T, M = A hoặc C)

AGATCCACTGCCGGWGAAGCGGGMGGGGACCCCAGTGTACCGGTT  
GGATGCCCC

#### Phương pháp và kết quả

Các mảnh đích được khuếch đại bằng sơ đồ khuếch đại như được nêu dưới đây:

Khuếch đại bước thứ 1: năm cặp đoạn môi (6H8-L1-F1+6H8-L1-R1, 6H8-L1-F2+6H8-L1-R3, 6H8-L1-F3+6H8-L1-R4, 6H8-L1\_F4+6H8-L1\_R6, 6H8-L1\_F6+6H8-L1\_R8) được sử dụng để khuếch đại năm mảnh bước thứ 1 từ vector pFL-6H8 thu được trong ví dụ 1. Điều kiện phản ứng PCR được thiết đặt như sau: 95°C, 3 phút; (95°C, 30 giây, 55°C, 30 giây, 72°C, 40 giây) x 40 chu kỳ; 72°C, 10 phút. Sau khi PCR, kích thước của các mảnh đã được khuếch đại được xác định trong quá trình điện di trên gel agarosa 1% và sau đó, được nối vào trong vector pMD18-T (TaKaRa). Các sản phẩm nối được biến nạp vào trong các tế bào có đủ khả năng, và các dòng vô tính được chọn và được sàng lọc đối với sự cài xen chính xác. Dựa trên các kết quả giải trình tự, các mảnh có trình tự chính xác lần lượt được gọi là 6H8-L1-1, 6H8-L1-2, 6H8-L1-3, 6H8-L1-4 và 6H8-L1-5.

Khuếch đại bước thứ 2: năm mảnh bước thứ 1 thu được trên đây (6H8-L1-1, 6H8-L1-2, 6H8-L1-3, 6H8-L1-4 và 6H8-L1-5) được sử dụng làm khuôn mẫu, và bốn cặp đoạn môi (6H8-L1-F1 + 6H8 -L1\_R2, 6H8-L1-F2 + 6H8-L1\_R5, 6H8-L1\_F4 + 6H8-L1\_R7, 6H8-L1\_F5 + 6H8-L1\_R8) được sử dụng để khuếch đại các mảnh bước



thứ 2. Điều kiện phản ứng PCR là giống như trong quá trình khuếch đại bước thứ 1. Sau khi PCR, các sản phẩm PCR được tinh chế bằng cách điện di trên gel agarosa 1%, và được nối vào trong vector pMD18-T (TaKaRa) và được biến nạp vào trong các tế bào có đủ khả năng. Các dòng vô tính tích cực được chọn và được sàng lọc đối với sự cài xen chính xác. Dựa trên các kết quả giải trình tự, các mảnh có trình tự chính xác lần lượt được gọi là 6H8-L1-6, 6H8-L1-9, 6H8-L1-7 và 6H8-L1-8.

Khuếch đại bước thứ 3: theo quy trình giống như khuếch đại bước thứ 1, hai mảnh bước thứ 2 thu được trên đây (6H8-L1-6 và 6H8-L1-9) được sử dụng làm khuôn mẫu, và một cặp đoạn mồi (6H8-L1-F1+6H8-L1\_R5) được sử dụng để thu được mảnh bước thứ 3 (6H8-L1-10); hai mảnh bước thứ 2 thu được trên đây (6H8-L1-7 và 6H8-L1-8) được sử dụng làm khuôn mẫu, và một cặp đoạn mồi (6H8-L1\_F4+6H8-L1\_R8) được sử dụng để thu được mảnh bước thứ 3 (6H8-L1-11).

Khuếch đại bước thứ 4: theo quy trình giống như khuếch đại bước thứ 1, các mảnh bước thứ 3 thu được trên đây (6H8-L1-10 và 6H8-L1-11) được sử dụng làm khuôn mẫu, một cặp đoạn mồi (6H8-L1-F1+6H8-L1\_R8) được sử dụng để thu được mảnh bước thứ 4 (6H8-L1-12).

Mảnh 6H8-L1-12 được phân cắt bằng các enzym giới hạn NcoI-HF và NotI-HF (NEB), tiếp theo tách bằng cách điện di trên gel agarosa 1%, và sau đó, mảnh đã được phân cắt được tinh chế bằng Gel Extraction Kit (Omega bio-tek). Mảnh phân cắt đã được tinh chế được nối với vector thể thực khuẩn pComb3Xss (bao gồm protein dung hợp c-myc đã được xử lý kỹ thuật trước vào trong khung của vector thể thực khuẩn) mà được phân cắt bằng cùng bộ enzym giới hạn (tức là NcoI-HF và NotI-HF) thông qua T4 ADN ligaza (TaKaRa). Sản phẩm nối được khử ion và sau đó, được biến nạp vào trong các tế bào TG1 có đủ khả năng thông qua xung điện. Các tế bào TG1 đã được biến nạp được gây nhiễm trên các đĩa LB để sàng lọc dòng vô tính. Độ lớn của thư viện thể thực khuẩn của kháng thể 6H8-L1 được ghi lại, và thư viện này được bảo quản ở nhiệt độ -80°C để sử dụng tiếp.

Việc quét tính đặc hiệu kháng nguyên của thư viện thể thực khuẩn của kháng thể 6H8-L1 được thực hiện bằng cách quét pha rắn, với các bước sau:

Thư viện thể thực khuẩn của kháng thể 6H8-L1 được làm sống lại trong 60 ml môi trường 2YT, và được ủ trong tủ ủ lắc ở nhiệt độ 37°C cho đến khi OD600 của môi trường nuôi cấy đạt tới 0,3-0,4. Thể thực khuẩn hỗ trợ M13KO7 (Invitrogen) được bổ sung vào, và môi trường nuôi cấy được ủ trong 30 phút trong tủ ủ yên và được ủ trong 60 phút trong tủ ủ lắc ở nhiệt độ 37°C. Môi trường nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi được loại bỏ, và các tế bào được tạo hỗn dịch lại bằng 60 ml môi trường 2YT chứa kanamycin 50 µg/ml (mà không chứa glucoza). Môi trường nuôi cấy đã được tạo hỗn dịch lại được ủ qua đêm trong tủ ủ lắc ở nhiệt độ 30°C, được ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút để kết tủa thư viện hiển thị trên thể thực khuẩn chứa vi khuẩn. Dịch nổi được chuyển vào trong ống ly tâm mới, được chia phần phân ước thành lô 30 ml/ống, 7,5 ml PEG/NaCl được bổ sung vào mỗi ống ly tâm, được trộn kỹ, được đặt trên đá trong 1 giờ, và được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút, dịch nổi được loại bỏ, và các thể thực khuẩn được tạo hỗn dịch lại bằng 2,2 ml dung dịch chứa PBS-5% BSA. Các thể thực khuẩn đã được tạo hỗn dịch lại được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút một lần nữa để loại bỏ các mảnh tế bào vụn.

Các đĩa được phủ BASIGIN của người được sử dụng để tiến hành quét ái lực trong 5 chu kỳ quét (gắn kết-rửa-khuếch đại), đối với mỗi chu kỳ quét, nồng độ phủ của kháng nguyên được giảm dần (1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,001 µg/ml, 0,0001 µg/ml). Thử nghiệm quét được kết thúc khi tỷ số tín hiệu trên nhiễu (signal-to-noise - S/N) là dưới 10. 768 dòng vô tính được chọn và các dòng vô tính đã chọn được nuôi cấy và được cảm ứng để biểu hiện các kháng thể scFv mà được sử dụng để phân tích ELISA.

Ví dụ 5: ELISA và phân tích giải trình tự

BASIGIN của người được pha loãng đến 1 µg/ml bằng dung dịch đệm phủ (200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, độ pH=9,2), 50 µl hỗn hợp này được bổ sung vào mỗi lỗ

của đĩa 96 lỗ và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Dung dịch phủ trong mỗi lỗ được loại bỏ và các đĩa được rửa bằng dung dịch đệm 1xPBS trong 3 lần, được phong bế bằng 200 µl dung dịch đệm phong bế (2% BSA/dung dịch đệm 1xPBS) mỗi lỗ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và sau đó, được rửa bằng 200 µl dung dịch đệm 1xPBS mỗi lỗ. Dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào chứa các kháng thể ScFv và đối chứng âm tính được bổ sung vào trong các lỗ riêng của đĩa, và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, các đĩa được rửa bằng 200 µl dung dịch đệm 1x PBS trong 3 lần. Ab kháng c-Myc (HRP) làm kháng thể thứ cấp (Abcam Cat # ab19312, 50 µl/lỗ) mà được pha loãng bằng dung dịch đệm phong bế (1: 2500) được bổ sung vào trong các lỗ riêng của đĩa, và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, các đĩa được rửa bằng 200 µl dung dịch đệm 1x PBS trong 6 lần. Dung dịch cơ chất TMB (50 µl/lỗ) được bổ sung vào mỗi lỗ để phản ứng trong 10 phút, và dung dịch làm ngừng (2 M HCl, 50 µl/lỗ) được bổ sung vào để kết thúc phản ứng. Hệ số hấp thụ ở 450 nm được đọc trong máy đọc đĩa ELISA. Theo các kết quả của ELISA, 123 dòng vô tính có A450 > 2,0 được chọn để phân tích giải trình tự.

Các trình tự ADN thu được từ việc giải trình tự được đánh giá về mức độ giống như của người dựa vào cơ sở dữ liệu dòng mầm globulin miễn dịch của người và trang web <http://www.bioinf.org.uk/abs/shab/>. 26 phân tử scFv có mức độ giống như của người cao nhất được chọn để phân loại ái lực.

Ví dụ 6: Xác định ái lực gắn kết scFv bằng SPR

Ái lực của kháng thể này được đo bằng ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Chip GLC (Bio-Rad, 1765011) được hoạt hóa bằng 0,04 M EDC + 0,01 M sulfo-NHS (Bio-Rad). BASIGIN của người được pha loãng đến 10 mM bằng 10 mM NaAc (độ pH=4,5) và sau đó, được tiêm lên trên chip ở tốc độ 30 µl/phút để ghép kháng nguyên với chip đã được hoạt hóa thông qua các nhóm amino. Cuối cùng, chip này được bất hoạt bằng 1 M etanolamin-HCl (Bio-Rad), và khi chip này được làm quay 90 độ, nó được rửa bằng dung dịch đệm (PBS/0,005% Tween 20) cho đến khi đường nền ổn định. Năm dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào chứa kháng thể scFv và một đối chứng âm tính lần lượt được tiêm trên sáu rãnh nằm ngang ở tốc độ nạp là 30 µl/phút. Thời gian để

gắn kết được thiết đặt là 60 giây và thời gian để phân ly được thiết đặt là 900 giây. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng mô hình Kinetic-Langmuir.

SPR được sử dụng để giám sát thời gian thực của gắn kết giữa BASIGIN của người với dịch nổi TG1 chứa các kháng thể scFv. Hằng số tốc độ liên kết ( $K_{on}$ ) của tất cả các kháng thể đã được sàng lọc là tương đương, do đó, hằng số tốc độ phân ly ( $K_{off}$ ) được sử dụng để xác định ái lực gắn kết của các kháng thể này thay cho  $K_D$ . Ái lực gắn kết của BASIGIN của người với các kháng thể scFv đã được làm giống như của người được đánh giá trước theo  $K_{off}$ , và các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1 Xác định bằng SPR các kết quả ái lực của kháng thể scFv

| Dòng vô tính số | $K_{off}(x10^{-5})$ | Dòng vô tính số | $K_{off}(x10^{-5})$ | Dòng vô tính số    | $K_{off}(x10^{-5})$ |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 11131           | 8,9                 | 11205           | 35                  | 11189              | 5,2                 |
| 11135           | 32                  | 11210           | 32                  | 11193              | 5,5                 |
| 11143           | 10                  | 11211           | 5,3                 | 11195              | 5,3                 |
| 11149           | 9,5                 | 11214           | 5,2                 | 11198              | 30                  |
| 11156           | 36                  | 11230           | 39                  | 11120              | 23                  |
| 11182           | 40                  | 11232           | 30                  | 11203              | 9,3                 |
| 11187           | 6,4                 | 11233           | 27                  | 11246              | 41                  |
| 11188           | 4,4                 | 11242           | 3,4                 | 11305              | 6,9                 |
| 11204           | 14                  | 11245           | 4,1                 | 6H8 của chuột nhất | 11,4                |

Có tính đến các dấu hiệu khác, năm scFv được làm giống như của người (tức là 11188, 11214, 11242, 11245 và 11305) được chọn từ các kháng thể có trị số  $K_{off}$  thấp hơn tương đối để lần lượt tạo cấu trúc các kháng thể nguyên vẹn.

Ví dụ 7: Tạo cấu trúc kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn

Theo các kết quả phân loại ái lực trước đó, năm dòng vô tính với các scFv được chọn được gây nhiễm qua đêm. Các plasmit được chiết từ mỗi môi trường nuôi cấy qua đêm, và các trình tự của chúng được xác nhận bằng cách giải trình tự.

Các đoạn môi sau được sử dụng để khuếch đại vùng biến đổi của chuỗi nặng được làm giống như của người (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được làm giống như của người (VL) để tạo ra kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn:

Đoạn mỗi xuôi VL: PCI-wbp229\_F1, SEQ ID NO: 51

GCTCCCCGGGGCGCGCTGTGACATTCAGATGACCCAATC

Đoạn mỗi ngược VL: pCI-6H8\_R8, SEQ ID NO: 52

GGTGCAGCCACCGTACGTTTTATTTCCAACCTTTGTCCCCGAG

Các đoạn mỗi xuôi VH bao gồm:

1) PCI-wbp229\_F2: SEQ ID NO: 53

CTCTCCACAGGTGTACACTCCGAAGTGCAGCTTCTGGAGTC

2) PCI-wbp229\_F3: SEQ ID NO: 54

CTCTCCACAGGTGTACACTCCGAAGTGCAGCTTGTGGAGTC

3) 6H8-L1\_R2: SEQ ID NO: 55

CCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGTTCATCCAGAAGTTACTGAAAGTG  
AATCCAG

4) 6H8-L1\_R5: SEQ ID NO: 56

GGTGACCCTGTCGCCCCACTGAGRSGGACAGGGWGGVGGGAGATTG  
GGTC

Đoạn mỗi ngược VH: PCI-wbp229\_R1, xem SEQ ID NO: 57

GGGCCCTTGGTCGACGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTC

Các mảnh đích được khuếch đại bằng sơ đồ khuếch đại như được nêu dưới đây:

Plasmit từ 11188 được sử dụng làm khuôn mẫu, các cặp đoạn mỗi (PCI-wbp229\_F1+pCI-6H8\_R8 và PCI-wbp229\_F2+PCI-wbp229\_R1) được sử dụng để khuếch đại các vùng VL và VH đối với kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn WBP229-201.

Plasmit từ 11214 được sử dụng làm khuôn mẫu, các cặp đoạn mỗi (PCI-wbp229\_F1+pCI-6H8\_R8 và PCI-wbp229\_F2+PCI-wbp229\_R1) được sử dụng

để khuếch đại các vùng VL và VH đối với kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn WBP229-202.

Plasmit từ 11242 được sử dụng làm khuôn mẫu, các cặp đoạn môi (PCI-wbp229\_F1+pCI-6H8\_R8 và PCI-wbp229\_F3+PCI-wbp229\_R1) được sử dụng để khuếch đại các vùng VL và VH đối với kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn WBP229-203.

Plasmit từ 11245 được sử dụng làm khuôn mẫu, các cặp đoạn môi (PCI-wbp229\_F1+pCI-6H8\_R8 và PCI-wbp229\_F2+PCI-wbp229\_R1) được sử dụng để khuếch đại các vùng VL và VH đối với kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn WBP229-204.

Plasmit từ 11305 được sử dụng làm khuôn mẫu, các cặp đoạn môi (PCI-wbp229\_F1+pCI-6H8\_R8 và PCI-wbp229\_F3+PCI-wbp229\_R1) được sử dụng để khuếch đại các vùng VL và VH đối với kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn WBP229-205.

Sau khi PCR, các mảnh đã được khuếch đại được tách ra trong quá trình điện di trên gel agarosa 1%, và các dải ở kích thước kỳ vọng được thu lại và được tinh chế.

Các mảnh VL/VH đã được tinh chế được phân cắt bằng NgoMIV và SnaBI, và các mảnh đã được phân cắt được tinh chế bằng kit tinh chế ADN, và sau đó, được nối với vectơ biểu hiện của động vật có vú pCI-vector mà chứa gen (vùng ổn định của chuỗi nặng hIgG2 hoặc vùng ổn định của chuỗi  $\kappa$  của người) và được phân cắt bằng cùng các enzym. Các sản phẩm nối được biến nạp vào trong các tế bào *E. coli* TOP10 (Invitrogen), và các tế bào đã được biến nạp được rải trên các đĩa thạch LB với 100  $\mu$ g/ml ampicillin. Sau đó, các dòng vô tính tích cực được gây nhiễm trong môi trường lỏng LB bằng 100  $\mu$ g/ml ampicillin, và sau khi dòng vô tính này được kiểm tra bằng cách giải trình tự, các plasmit dòng vô tính được chiết bằng cách sử dụng kit chiết plasmit Midi-Prep (QIAGEN). Các plasmit tạo ra được lần lượt có tên là pCI-WBP229-201L và pCI-WBP229-201H, pCI-WBP229-202L và pCI-WBP229-202H, pCI-WBP229-203L và pCI-WBP229-203H, pCI-WBP229-204L

và pCI-WBP229-204H, pCI-WBP229-205L và pCI-WBP229-205H, mỗi plasmit này chứa gen chuỗi nhẹ đầy đủ hoặc gen chuỗi nặng đầy đủ để sản xuất kháng thể được làm giống như của người nguyên vẹn.

Ví dụ 8: Chuyển nạp tạm thời của các tế bào và tinh chế kháng thể

Các tế bào HEK293 ( $1,0 \times 10^6$  tế bào/ml) được đồng chuyển nạp bằng một cặp plasmit chứa một gen chuỗi nhẹ và một gen chuỗi nặng tương ứng (ví dụ, pCI-WBP229-201L/H~205L/H) bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nạp Freestyle Max Reagent từ Invitrogen. Các tế bào đã được chuyển nạp được gây nhiễm trong tủ ủ lắc ở nhiệt độ 37°C bằng 5% CO<sub>2</sub>, và tốc độ xoay là 120 vòng/phút. Dịch nổi môi trường nuôi cấy được gom lại sau 7 ngày sau chuyển nạp bằng cách ly tâm, và cột sắc ký ái lực Protein A được sử dụng để tách và tinh chế các kháng thể đích từ dịch nổi. Ba môi trường nuôi cấy có mức độ tạo ra kháng thể được làm giống như của người cao nhất được chọn, các kháng thể này là:

1) HP6H8-1 (tương ứng với pCI-WBP229-205L/H) có trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 3, và trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 16.

2) HP6H8-2 (tương ứng với pCI-WBP229-204L/H) có trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5, và trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 18.

3) HP6H8-3 (tương ứng với pCI-WBP229-203L/H) có trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 20.

Ví dụ 9: Xác định ái lực gắn kết của các kháng thể kháng hBASIGIN được làm giống như của người

200 ng protein tái tổ hợp BASIGIN của người được phủ trong đĩa ELISA và để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Đĩa đã phủ được phong bế bằng 0,1% BSA ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Ba kháng thể thu được trong ví dụ 8 cùng với kháng thể 6H8

đơn dòng gốc của chuột nhất và kháng thể khảm c6H8, mỗi kháng thể được chuẩn bị thành 5 dung dịch có các nồng độ gradien là 10, 100, 1.000, 10.000 và 100.000 ng/ml. 100  $\mu$ l mỗi dung dịch được bổ sung vào trong các lỗ riêng và đĩa được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. 100  $\mu$ l vùng ổn định của chuỗi nhẹ của dê kháng người được đánh dấu bằng peroxidaza củ cải ngựa, được pha loãng theo tỷ lệ 1:4.000 làm kháng thể thứ cấp (Millipore) được bổ sung vào và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, các đĩa được rửa bằng 200  $\mu$ l dung dịch đệm 1x PBS trong 3 lần, dung dịch cơ chất TMB (50  $\mu$ l/lỗ) được bổ sung vào mỗi lỗ để phản ứng trong 10 phút, và dung dịch làm ngừng (2 M HCl, 50  $\mu$ l/lỗ) được bổ sung vào để kết thúc phản ứng. Hệ số hấp thụ ở 450 nm được đọc trong máy đọc đĩa ELISA.

Theo kết quả, ba kháng thể được làm giống như của người và kháng thể khảm c6H8 thể hiện ái lực với BASIGIN của người cao hơn một cách đáng kể khi so với kháng thể gốc của chuột nhất 6H8 (Fig.3).

Ái lực gắn kết của ba kháng thể được làm giống như của người, kháng thể của chuột nhất 6H8 và kháng thể khảm c6H8 cũng được xác định bằng SPR (về các bước chi tiết, xem phần mô tả trong ví dụ 6), dữ liệu được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Xác định bằng SPR ái lực gắn kết của các kháng thể được làm giống như của người

| Mẫu                         | $K_a$<br>(1/mgiây) | $K_d$<br>(1/giây) | $K_D$ (M) | $R_{max}$<br>(RU) | $Chi^2$<br>(RU) |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------------|
| 6H8 đơn dòng của chuột nhất | 5,66E+04           | 6,64E-05          | 1,17E-09  | 175,08            | 3,20            |
| c6H8                        | 1,28E+05           | 5,81E-05          | 4,52E-10  | 98,59             | 4,00            |
| HP6H8-3                     | 5,31E+05           | 5,44E-05          | 1,02E-10  | 88,59             | 1,23            |
| HP6H8-2                     | 6,18E+05           | 3,60E-05          | 5,83E-11  | 120,50            | 2,29            |
| HP6H8-1                     | 5,48E+05           | 4,96E-05          | 9,05E-11  | 57,32             | 1,08            |



Như được thể hiện trên Fig.3 và bảng 2, ái lực gắn kết của các kháng thể được làm giống như của người là cao hơn so với ái lực gắn kết của kháng thể gốc của chuột nhất 6H8. Khả năng sinh miễn dịch của các kháng thể được làm giống như của người trong người là thấp hơn so với khả năng sinh miễn dịch của kháng thể gốc của chuột nhất 6H8 và độ ổn định của các kháng thể được làm giống như của người là tốt hơn so với độ ổn định của kháng thể gốc của chuột nhất 6H8.

Ví dụ 10: Tạo cấu trúc vector biểu hiện kháng thể kháng hBASIGIN được làm giống như của người có hiệu quả cao và sàng lọc các dòng tế bào biểu hiện ổn định

Theo các kết quả của ví dụ 9, trình tự gen của HP6H8-1 được sử dụng để tạo cấu trúc vector biểu hiện kháng thể được làm giống như của người có hiệu quả cao.

#### 1. Tạo cấu trúc vector biểu hiện gen của chuỗi nhẹ

Trình tự gen mã hóa vùng VL của HP6H8-1 được tổng hợp và được bổ sung các vị trí nhận biết enzym giới hạn của XbaI và BsiWI lần lượt ở các đầu 5' và 3' của trình tự. Phân tử tổng hợp được và plasmit pcDNA3.3-LC-104new-M có gen ổn định của chuỗi nhẹ được phân cắt bằng các enzym giới hạn XbaI và BsiWI. Các sản phẩm đã được phân cắt được tách trong quá trình điện di trên gel agarosa 1%, và các dải ở kích thước kỳ vọng được thu lại và được tinh chế. Các mảnh đã được tinh chế (mảnh có kích thước 416bp có nguồn gốc từ phân tử tổng hợp và mảnh có kích thước 5.712bp có nguồn gốc từ plasmit pcDNA3.3-LC-104new-M) được nối bằng cách sử dụng T4 ligaza và hỗn hợp phản ứng được giữ ở nhiệt độ 16°C trong 20 phút. 10 µl trong số 20 µl dung dịch nối được sử dụng để biến nạp các tế bào *E. coli* TOP10 có đủ khả năng (Invitrogen). Sau khi các khuẩn lạc đã được biến nạp được xác nhận bằng cách phân tích PCR, phân tích phân cắt enzym và giải trình tự, một dòng vô tính đơn chính xác được gây nhiễm qua đêm trong 200ml môi trường LB ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ lắc với tốc độ 220 vòng/phút. Plasmit được chiết và được đặt tên pcDNA3.3-LC-N-229-205 (được thể hiện trên Fig.4).

#### 2. Tạo cấu trúc vector biểu hiện gen của chuỗi nặng

Tương tự, trình tự gen mã hóa vùng VH của HP6H8-1 được tổng hợp và được bổ sung các vị trí nhận biết enzym giới hạn của XbaI và NheI lần lượt ở các đầu 5' và 3' của trình tự. Phân tử tổng hợp được và plasmid pOptivec-HC-208-M có gen ổn định của chuỗi nặng được phân cắt bằng các enzym giới hạn XbaI và NheI. Các sản phẩm đã được phân cắt được tách trong quá trình điện di trên gel agarosa 1%, và các dải ở kích thước kỳ vọng được thu lại và được tinh chế. Các mảnh đã được tinh chế (mảnh có kích thước 434bp có nguồn gốc từ phân tử tổng hợp và mảnh có kích thước 5.364bp có nguồn gốc từ plasmid pOptivec-HC-208-M) được nối bằng cách sử dụng T4 ligaza và hỗn hợp phản ứng được giữ ở nhiệt độ 16°C trong 20 phút. 10 µl trong số 20 µl dung dịch nối được sử dụng để biến nạp các tế bào *E. coli* TOP10 có đủ khả năng (Invitrogen). Sau khi các khuẩn lạc đã được biến nạp được xác nhận bằng cách phân tích PCR, phân tích phân cắt enzym và giải trình tự, một dòng vô tính đơn chính xác được gây nhiễm qua đêm trong 200ml môi trường LB ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ lắc với tốc độ 220 vòng/phút. Plasmid được chiết và được đặt tên pOptivec-HC-D-229-205 (được thể hiện trên Fig.5).

### 3. Tạo cấu trúc và sàng lọc các dòng tế bào biểu hiện ổn định CHO

Vector biểu hiện của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống như của người pcDNA3.3-LC-N-229-205 và vector biểu hiện của chuỗi nặng của kháng thể được làm giống như của người pOptivec-HC-D-229-205 được chuyển nạp vào trong các tế bào CHO/DHFR bằng cách sử dụng Freestyle Max Reagent (Invitrogen). 48 giờ sau khi chuyển nạp, ban đầu các tế bào được cấy truyền và được sàng lọc bằng môi trường Opti CHO được bổ sung 500 µg/ml G418 cho đến khi khả năng sống của tế bào được khôi phục đến trên 85%. Việc sàng lọc lần thứ hai được thực hiện trong môi trường sàng lọc chứa 500 nM MTX. Dòng vô tính đơn được chọn bằng ClonePix FL. Sau 7-10 ngày nuôi cấy đơn dòng, mức độ biểu hiện của HP6H8-1 trong dịch nổi môi trường nuôi cấy là  $2,23 \pm 0,18$  g/l khi được đo bằng phương pháp HTRF (được thể hiện trên Fig.6).

Ví dụ 11: Xác định tính đặc hiệu của kháng thể kháng hBASIGIN được làm giống như của người

Phương pháp hóa mô miễn dịch được sử dụng để phát hiện việc gắn kết đặc hiệu của kháng thể HP6H8-1 với mô khối u, và khả năng phản ứng chéo hóa mô miễn dịch của kháng thể này được khảo sát. Dung dịch  $H_2O_2$  3% được sử dụng để phong bế và làm bất hoạt peroxidaza nội sinh, dung dịch thử nghiệm chứa huyết thanh cừu bình thường được sử dụng để phong bế, HP6H8-1 được sử dụng làm kháng thể sơ cấp, kháng thể Fc của thỏ kháng người được đánh dấu bằng biotin được sử dụng làm kháng thể thứ cấp, dung dịch streptomycin albumin được đánh dấu bằng peroxidaza củ cải ngựa được sử dụng làm chất phản ứng đánh dấu, DAB được sử dụng để màu hóa, và hematoxylin được sử dụng để nhuộm lại. Sau khi mẫu được loại nước, các phiến kính mang nó được đặt để kiểm tra bằng kính hiển vi.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.7, sự màu hóa đặc hiệu của kháng thể HP6H8-1 được quan sát ở bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết tràng và các mô khối u ác tính khác, nhưng hiếm khi ở các mô bình thường, các mức độ màu hóa khác nhau được đánh dấu dưới dạng "++" hoặc "+++".

Các kết quả trên cho thấy rằng kháng thể được làm giống như của người tạo ra được trong sáng chế dựa trên việc ghép CDR có thể nhận biết một cách đặc hiệu BASIGIN của người.

Ví dụ 12: Thử nghiệm chống sốt rét in vitro bằng kháng thể HP6H8-1

Hồng cầu của người (typ O) lần lượt được gây nhiễm bằng Plasmodium falciparum các chủng Dd2, 3D7, FCC1 và Nf54. Khi mức độ nhiễm trùng là  $\geq 1\%$  và tiểu thể sốt rét hoa hồng (malarial roset) là  $\geq 80\%$ , thì thử nghiệm chống sốt rét được thực hiện. Môi trường nuôi cấy được pha loãng bằng kháng thể đơn dòng để thiết đặt lượng ký sinh trùng trong máu ban đầu đến 0,5%, hồng cầu mới được bổ sung vào để thiết đặt lượng hematocrit ban đầu đến 2%, kháng thể đơn dòng HP6H8-1 lần lượt được bổ sung vào ở các nồng độ 100, 10, 1, 0,1, 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , mỗi gradien nồng độ được thử nghiệm ba lần. Sau khi nuôi cấy trong 72 giờ ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ , kính phết máu mỏng được chuẩn bị và được quan sát dưới kính hiển vi dầu 100x để tính mức độ ký

sinh trùng. Thử nghiệm này được lặp lại một cách độc lập ba lần, các kết quả được tính trung bình, và được phân tích bằng SPSS để thống kê.

Các kết quả được lực học in vitro của kháng thể đơn dòng HP6H8-1 được làm giống như của người đối với *Plasmodium falciparum* các chủng Dd2, 3D7, FCC1 và Nf54 được thể hiện trên Fig.8. Sau 72 giờ sau khi dùng kháng thể, kháng thể đơn dòng được làm giống như của người HP6H8-1 thể hiện tác dụng chống sốt rét đáng kể với tất cả các chủng *Plasmodium falciparum*, và IC50 lần lượt là 0,04, 0,02, 0,04, và 0,05 mg/ml.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Fourth Military Medical University

<120> Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người và chế phẩm chứa kháng thể này

<130> 022079-8006WO01

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng được làm giống như của người của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có biến đổi

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (5)..(5)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (23)..(23)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (49)..(49)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (79)..(80)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (89)..(89)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (94)..(94)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Xaa | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Xaa | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asn | Phe |
|     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |     |

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Glu | Ile | Arg | Leu | Lys | Ser | Asn | Asn | Tyr | Ala | Thr | His | Tyr | Ala | Glu |
|     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Xaa | Thr | Glu | Asp | Thr | Xaa | Val | Tyr |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Cys | Thr | Ser | Tyr | Asp | Tyr | Glu | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Ser | Ala |
|     |     |     | 115 |

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được làm giống như của người của kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có biến đổi

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (9)..(10)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (13)..(13)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (21)..(22)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (42)..(43)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (60)..(60)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (65)..(65)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (80)..(81)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (83)..(83)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 2

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Xaa Xaa Pro Lys Leu Leu Ile  
                    35                      40                      45

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

Xaa Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Xaa  
65                      70                      75                      80

Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe  
                    85                      90                      95

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

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1



&lt;400&gt; 3

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 Asn Phe  
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ser Tyr Asp Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ala  
 115

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của  
 kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1

&lt;400&gt; 4

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgaggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aacttctgga tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaagg ggcttgagtg ggtttccgaa attagattga aatctaataa ttatgcaaca 180  
 cattatgcgg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaaacacc 240  
 ctgtacctgc agatgaactc cttaaagact gaagacactg ccgtgtatta ctgtaccagc 300  
 tatgattacg aatactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của kháng thể được làm giống như của người HP6H8-2

<400> 5

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe  
 20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ser Tyr Asp Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                             100                            105                            110

Thr Val Ser Ala  
                             115

<210> 6

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của  
                             kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1

<400> 6

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgaagctc 60

tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aacttctgga tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggcttgagtg ggttgccgaa attagattga aatctaataa ttatgcaaca 180

cattatgcgg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaaacacc 240

ctgtacctgc aaatgaactc ctttaaggact gaagacactg ccgtgtatta ctgtaccagc 300

tatgattacg aatactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của  
                             kháng thể được làm giống như của người HP6H8-3

&lt;400&gt; 7

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe  
 20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ser Tyr Asp Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ala  
 115

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của  
 kháng thể được làm giống như của người HP6H8-3

&lt;400&gt; 8

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Gly  
 1                      5                      10                      15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr  
                     20                      25                      30

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala  
                     35                      40                      45

Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr  
                     50                      55                      60

Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr  
 65                      70                      75                      80

Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Cys  
                     85                      90                      95

Thr Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys  
                     100                      105                      110

Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala  
                     115                      120                      125

Gly Gly Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr  
                     130                      135                      140

Gly Cys Cys Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Gly Ala Thr Thr Gly Ala  
 145                      150                      155                      160

Ala Ala Thr Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys  
                     165                      170                      175

Ala Ala Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Gly Gly Ala Gly  
 180 185 190

Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Thr  
 195 200 205

Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala  
 210 215 220

Thr Gly Ala Thr Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Cys  
 225 230 235 240

Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala  
 245 250 255

Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Cys Thr Gly Ala  
 260 265 270

Ala Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr  
 275 280 285

Thr Ala Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly  
 290 295 300

Ala Thr Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly  
 305 310 315 320

Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Gly Thr Cys  
 325 330 335

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Cys Ala  
 340 345

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> HCDR1  
 <222> (1)..(10)

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp Met Asn  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> HCDR2  
 <222> (1)..(19)

<400> 10

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>

<221> HCDR3  
 <222> (1)..(5)

<400> 11

Tyr Asp Tyr Glu Tyr  
 1 5

<210> 12  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X= axit amin bất kỳ

<220>  
 <221> trình tự lỗi  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa Ala Ser  
 20 25

<210> 13  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> FR2 của chuỗi nặng của người  
 <222> (1)..(14)



<400> 13

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Xaa  
1 5 10

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FR3 của chuỗi nặng của người

<222> (1)..(32)

<400> 14

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Xaa Xaa Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Xaa Thr Glu Asp Thr Xaa Val Tyr Tyr Cys Thr Ser  
20 25 30

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FR4 của chuỗi nặng của người

<222> (1)..(11)

<400> 15

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

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1

<400> 16

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe  
85 90 95

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

<210> 17

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể được làm giống như của người HP6H8-1

<400> 17

```

gacattcaga tgaccaatc tccctccacc ctgtccgcct cagtgggcga cagggtcacc      60
ctctcctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgtat cctggtatca acagaaacca      120
ggcaaggccc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtcccctcc      180
cgcttcaccg gcagtggatc tggcacagat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccc      240
gaggacttcg caacctatta ctgtggacag agttacagct atccattcac gttcggctcg      300
gggacaaaagt tggaaataaa a                                              321

```

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể được làm giống như của người HP6H8-2

<400> 18

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe  
85 90 95

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

<210> 19

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của  
kháng thể được làm giống như của người HP6H8-2

<400> 19

gacattcaga tgacccaatc tccgcctcc ctgtccgcct cagtgggcga caggggcacc 60

atctcctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgtat cctgggtatca acagaaacca 120

ggccagaccc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtcccctcc 180

cgcttctccg gcagtggatc tggcacagat ttcaactctga ccatcagcag tctgcagccc 240

gacgacttcg caacctatta ctgtggacag agttacagct atccattcac gtteggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của  
kháng thể được làm giống như của người HP6H8-3

&lt;400&gt; 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 Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe  
 85 90 95

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

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của  
 kháng thể được làm giống như của người HP6H8-3

&lt;400&gt; 21

gacattcaga tgaccaatc tccctcctcc ctgtccgcct cagtgggcga cagggtcacc 60

ctcacctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgtat cctgggtatca acagaaacca 120

ggccaggccc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtcccctcc 180  
 cgcttcaccg gcagtggatc tggcacagat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccc 240  
 gacgacttcg caacctatta ctgtggacag agttacagct atccattcac gttcggctcg 300  
 gggacaaaagt tggaaataaa a 321

<210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> LCDR1  
 <222> (1)..(11)

<400> 22

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

<210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> LCDR2  
 <222> (1)..(7)

<400> 23

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> LCDR3

<222> (1)..(9)

<400> 24

Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FR1 của chuỗi nhẹ của người

<222> (1)..(23)

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Xaa Xaa Leu Ser Xaa Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Xaa Xaa Cys

20

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FR2 của chuỗi nhẹ của người

<222> (1)..(15)

<400> 26

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

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FR3 của chuỗi nhẹ của người

<222> (1)..(32)

<400> 27

Gly Val Pro Xaa Arg Phe Thr Gly Xaa Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Xaa Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FR4 của chuỗi nhẹ của người

<222> (1)..(10)

<400> 28

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

<210> 29

<211> 107

<212> PRT



<213> Mus musculus

<220>

<221> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của 6H8

<222> (1)..(107)

<400> 29

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr  
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Phe  
85 90 95

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

<210> 30

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của 6H8

<222> (1)..(321)

<400> 30

```

aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtgggcga gagggtcacc      60

ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgtat cctggtatca acagaaacca      120

gagcagtctc ctaaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat      180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct      240

gaagaccttg cagattatca ctgtggacag agttacagct atccattcac gttcgggctcg      300

gggacaaagt tggaaataaa a                                              321

```

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng của 6H8

<222> (1)..(116)

<400> 31

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
          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 Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Tyr Asp Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 32  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng của 6H8  
 <222> (1)..(348)

<400> 32  
 gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60  
 tcctgtgttg cctctggatt cactttcagt aacttctgga tgaactgggt ccgccagtct 120  
 ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagattga aatctaataa ttatgcaaca 180  
 cattatgctg agtctgtgaa agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240  
 gtctacctgc agatgaacaa cttagaact gaagacactg gcatttatta ctgtaccagc 300  
 tatgattacg aatactgggg ccaagggact ctggtcaccg tctctgca 348

<210> 33  
 <211> 38  
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pFL-6H8-F1

<400> 33

cccagccggc catggccgaa gtgaagcttg aggagtct

38

<210> 34

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cầu nối-R1

<400> 34

caaagttgga aataaaagcg gccgcagaac aaaa

34

<210> 35

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cầu nối-F1

<400> 35

ttttgttctg cggccgcttt tatttccaac ttg

34

<210> 36

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pFL-6H8-R2

<400> 36

ttttgttctg cggccgcttt tatttccaac ttg

34

<210> 37  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 6H8-L1-F1

<400> 37  
 cagccggcca tggccgaagt gcagcttggtg gagtctg

37

<210> 38  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 6H8-L1-F2

<220>  
 <221> trình tự lỗi  
 <222> (34)..(35)  
 <223> R = G hoặc A, S = G hoặc C

<400> 38  
 cgccaggctc cagggaagg gcttgagtgg gttrscgaaa ttagattgaa atc

53

<210> 39  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 6H8-L1-F3

<220>  
 <221> trình tự lỗi  
 <222> (17)..(17)  
 <223> R = G hoặc A

<400> 39  
cagatgaact ccttaargac tgaagacact gccgtgtatt actgtaccag 50

<210> 40  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> 6H8-L1-R1

<220>  
<221> trình tự lỗi  
<222> (21)..(21)  
<223> M = A hoặc C

<220>  
<221> trình tự lỗi  
<222> (32)..(32)  
<223> Y = T hoặc C

<400> 40  
gaaagtgaat ccagaggcgg macaggagag cytcagggat cctccagg 48

<210> 41  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> 6H8-L1\_R2

<400> 41  
ccctggagcc tggcggaccc agttcatcca gaagttactg aaagtgaatc cag 53

<210> 42  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1-R3

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (36)..(36)

<223> R = G hoặc A

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (39)..(39)

<223> K = G hoặc T

<400> 42

taaggagttc atctgcaggt acaggrtgkt tttggaatca tctcttg

47

<210> 43

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1-R

<400> 43

gggagattgg gtcattctgaa tgctcgctagc accgccac

38

<210> 44

<211> 49

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1\_R5

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (23)..(24)

<223> R = G hoặc A, S = G hoặc C

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (33)..(33)

<223> W = A hoặc T

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (36)..(36)

<223> V = G hoặc C hoặc A

<400> 44

ggtgaccctg tcgcccactg agrsggacag ggwgvgvgga gattgggtc

49

<210> 45

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1\_F4

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (19)..(19)

<223> M = A hoặc C

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (22)..(22)

<223> W = A hoặc T

<400> 45

gtgggcgaca gggtcacmt cwcctgcaag gccagtga

39

<210> 46

<211> 53

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>



<223> 6H8-L1\_F6

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (15)..(15)

<223> Y = T hoặc C

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (20)..(20)

<223> S = G hoặc C

<220>

<221> trình tự lỗi

<222> (24)..(24)

<223> W = A hoặc T

<400> 46

tcagcagctct gcagycggas gacwtcgcaa cctattactg tggacagagt tac

53

<210> 47

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1\_F5

<400> 47

ccggcagtg atctggcaca gatttcactc tgaccatcag cagtctgcag

50

<210> 48

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1\_R6

<220>

<221> trình tự lỗi  
 <222> (33)..(33)  
 <223> H = A hoặc C hoặc T

<220>  
 <221> trình tự lỗi  
 <222> (36)..(36)  
 <223> K = G hoặc T

<400> 48  
 gttggatgcc ccgtatatca gcagtttagg gghctkgcct ggtttctgtt g

51

<210> 49  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 6H8-L1\_R8

<400> 49  
 tttgttctgc ggccgctttt atttccaact ttgtccc

37

<210> 50  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 6H8-L1\_R7

<220>  
 <221> trình tự lỗi  
 <222> (15)..(15)  
 <223> W = A hoặc T

<220>  
 <221> trình tự lỗi  
 <222> (24)..(24)  
 <223> M = A hoặc C

<400> 50  
 agatccactg cggwgaagc gggmggggac cccagtgtac cggttggatg cccc 54

<210> 51  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> PCI-wbp229\_F1

<400> 51  
 gctccccggg gcgcgctgtg acattcagat gacccaato 39

<210> 52  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> pCI-6H8\_R8

<400> 52  
 ggtgcagcca ccgtacgttt tatttccaac tttgtccccg ag 42

<210> 53  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> PCI-wbp229\_F2

<400> 53  
 ctctccacag gtgtacactc cgaagtgcag cttctggagt c 41

<210> 54  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCI-wbp229\_F3

<400> 54

ctctccacag gtgtacactc cgaagtgcag cttgtggagt c

41

<210> 55

<211> 53

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1\_R2

<400> 55

ccctggagcc tggcggaccc agttcatcca gaagttactg aaagtgaatc cag

53

<210> 56

<211> 49

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 6H8-L1\_R5

<400> 56

ggtgaccctg tcgcccactg agrsggacag ggwgvgvgga gattgggtc

49

<210> 57

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCI-wbp229\_R1

<400> 57

gggcccttgg tcgacgctgc agagacagtg accagagtc

39

### Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm các trình tự axit amin của CDR của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 và SEQ ID NO:11 và các trình tự axit amin của CDR của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 và SEQ ID NO:24, và bao gồm:

trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:16 và trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:3,

trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:18 và trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:5, hoặc

trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:20 và trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:7.

2. Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên là mảnh kháng thể được chọn từ  $F(ab')_2$ , Fab', Fab, Fv, scFv, dsFv hoặc dAb.

3. Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó nó bao gồm vùng ổn định của chuỗi nặng IgG của người.

4. Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó IgG của người là IgG2 của người.

5. Kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó nó bao gồm vùng ổn định của chuỗi  $\kappa$  của người.
6. Trình tự axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể kháng BASIGIN được làm giống như ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 5.
7. Trình tự axit nucleic phân lập theo điểm 6, trong đó trình tự này bao gồm:  
trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:4 và trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:17,  
trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:6 và trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:19, hoặc  
trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng như được nêu trong SEQ ID NO:8 và trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được nêu trong SEQ ID NO:21.
8. Trình tự axit nucleic phân lập theo điểm 7, trong đó trình tự này còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa vùng ổn định của chuỗi nặng IgG của người hoặc chuỗi  $\kappa$  của người.
9. Vector chứa trình tự axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 tới 8.
10. Tế bào vật chủ chứa vector theo điểm 9.
11. Tế bào vật chủ theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào CHO.



Các biến đổi axit amin được chọn trong các khung VL được làm giống như của người

[illegible]

Fig.2



3/5

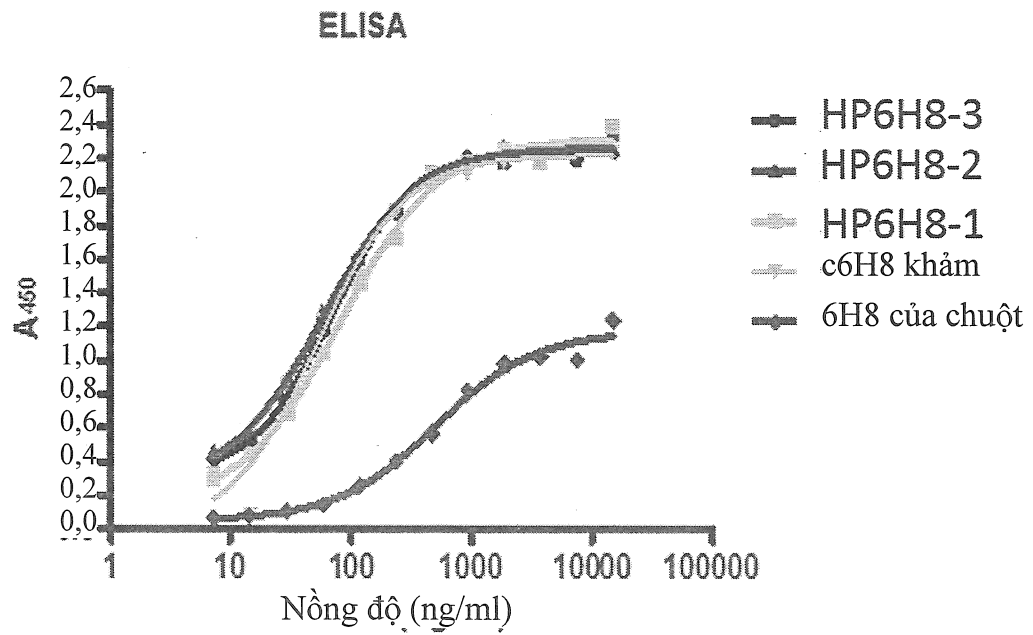


Fig.3

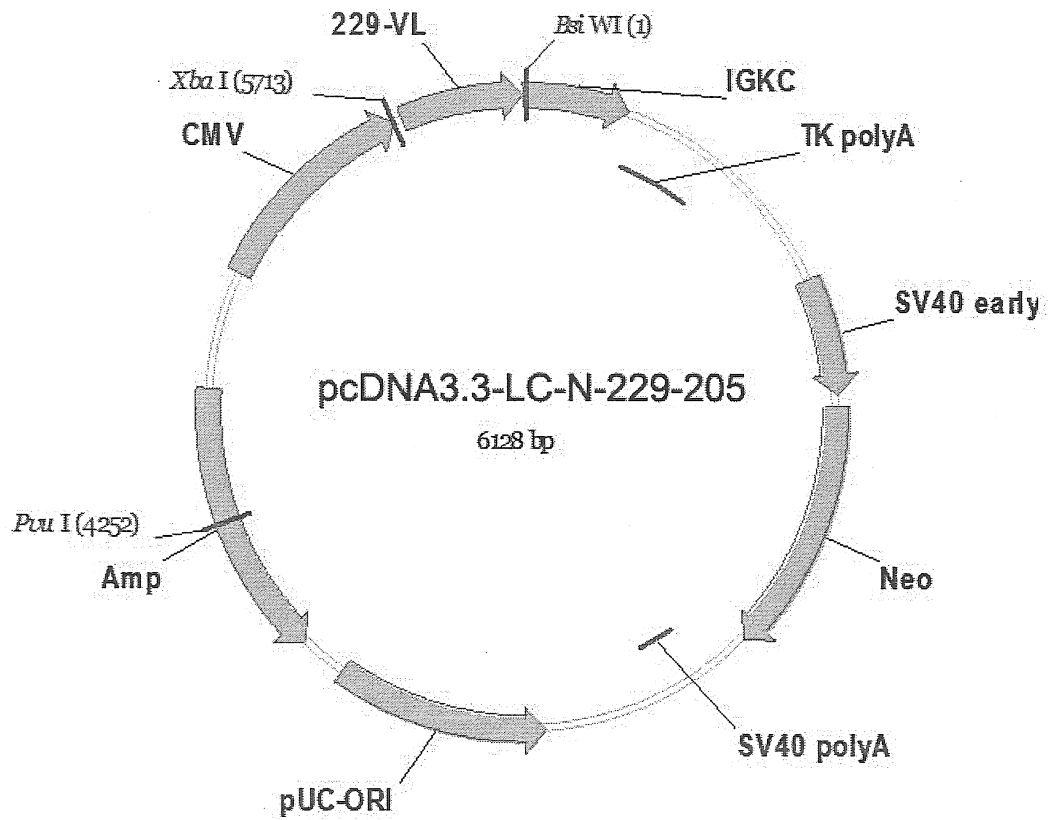


Fig.4

4/5

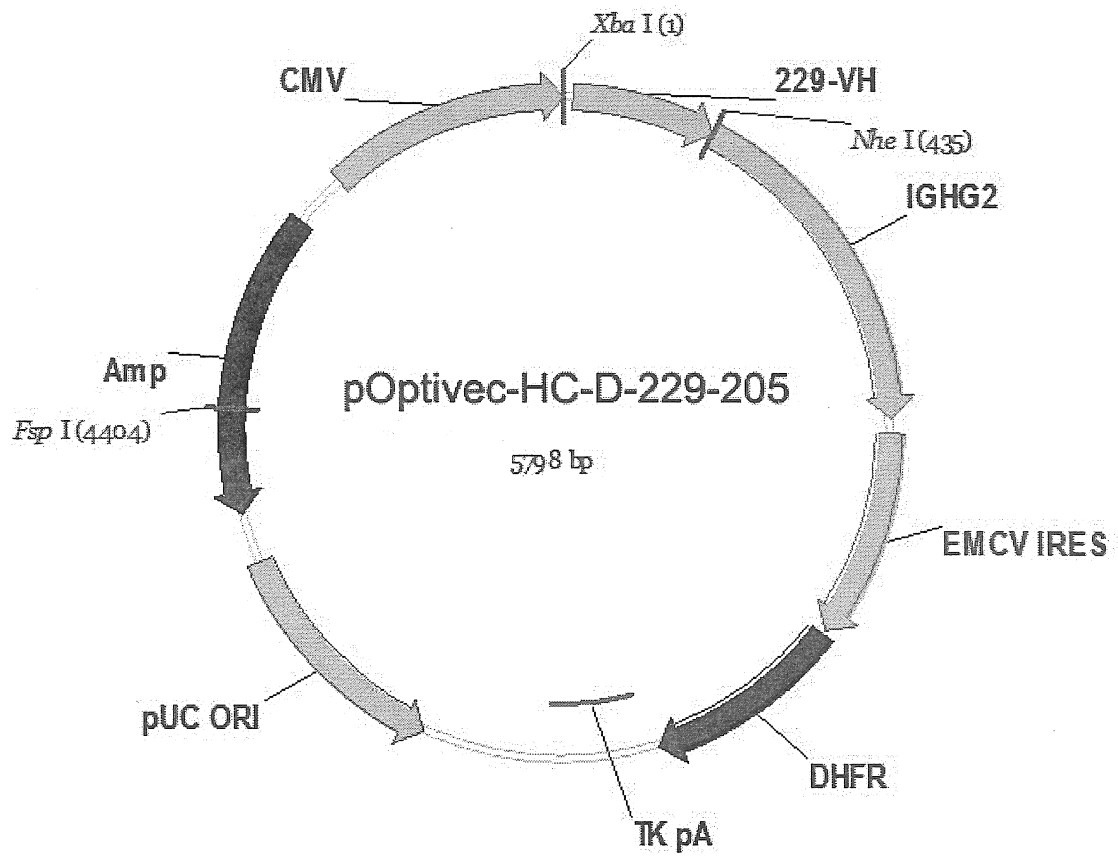


Fig.5

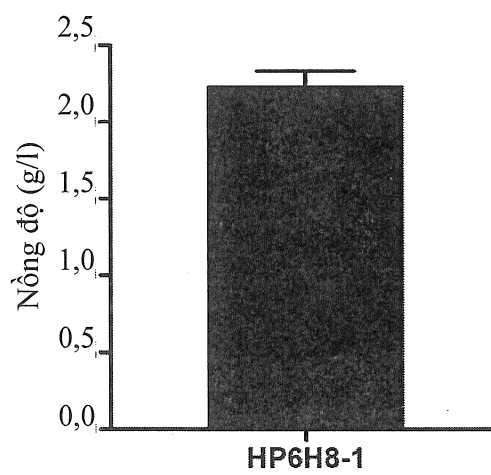


Fig.6

5/5

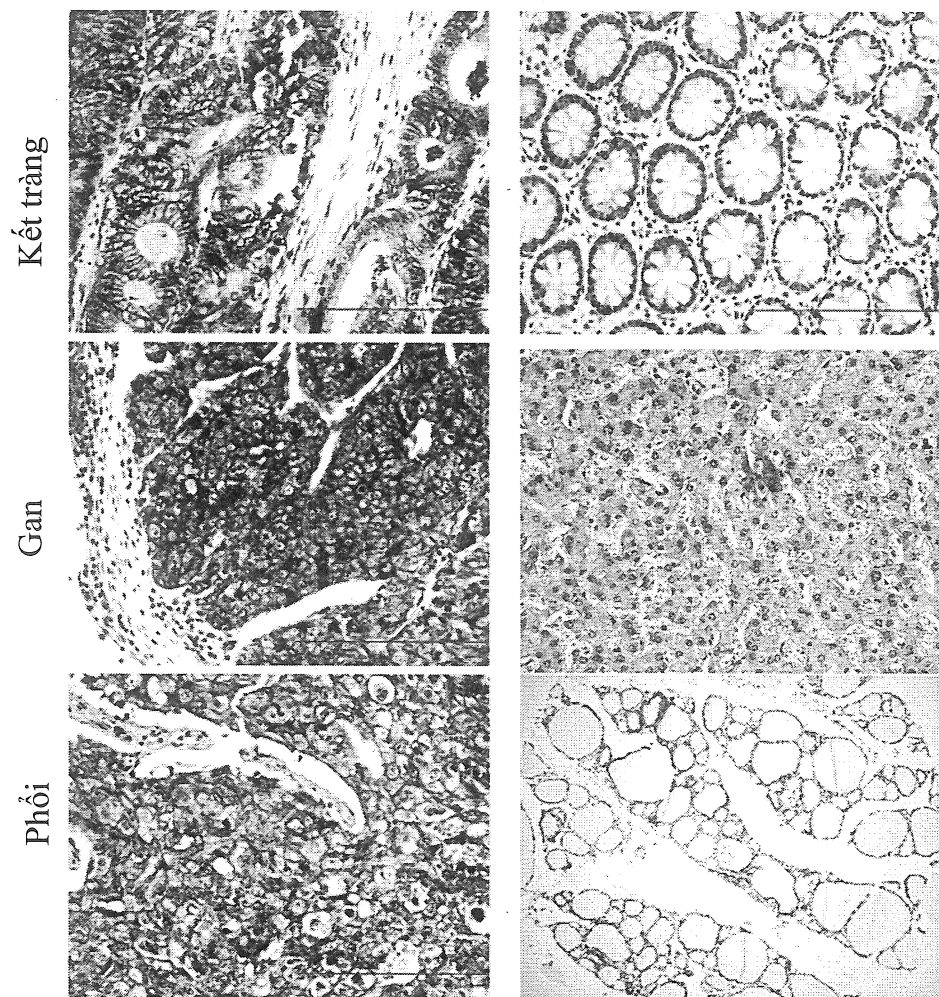


Fig.7

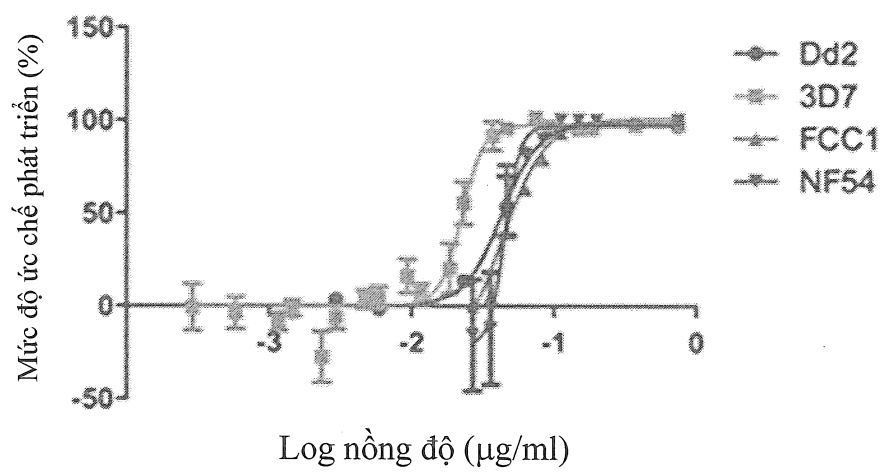


Fig.8