



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

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

(11)



1-0041710

(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2020-01857

(22) 22/10/2018

(86) PCT/KR2018/012492 22/10/2018

(87) WO2019/078697 25/04/2019

(30) 10-2017-0136564 20/10/2017 KR

(45) 25/11/2024 440

(43) 27/07/2020 388

(73) 1. GREEN CROSS CORPORATION (KR)

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

2. MOGAM INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH (KR)

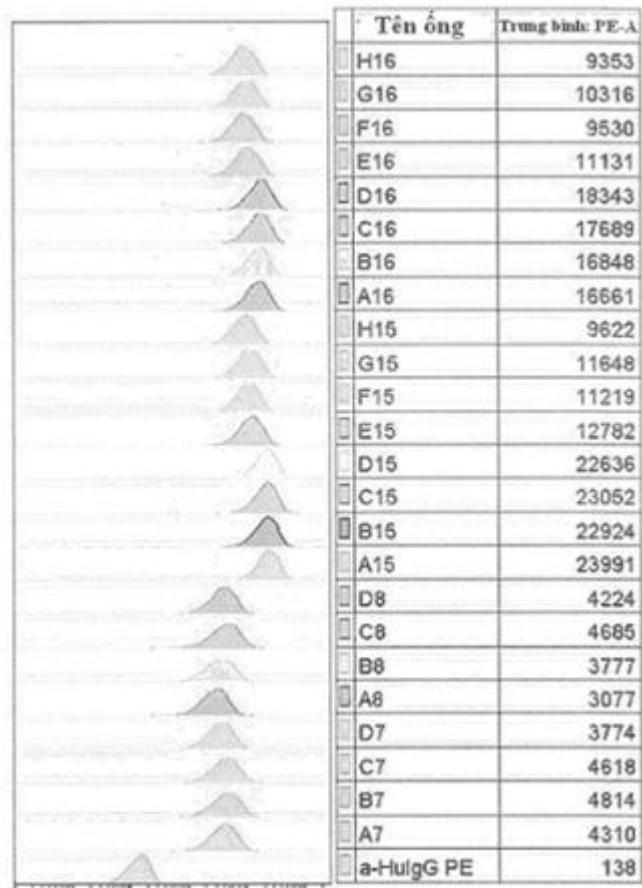
93, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16924, Republic of Korea

(72) KIM, Ki Su (KR); JEONG, Jun Hong (KR); YOON, Ae Rin (KR); SONG, Eun Jung (KR); CHOI, Hye Ji (KR); LIM, Ok Jae (KR); LEE, Yun Jung (KR); LIM, Hyung Kwon (KR); WON, Jong Wha (KR).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CỤM BIỆT HÓA 3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng cụm biệt hóa 3, polynucleotit mã hóa kháng thể này, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit này, tế bào vật chủ, phương pháp sản xuất kháng thể này và dược phẩm chứa kháng thể này để điều trị bệnh ung thư. Kháng thể theo sáng chế có ái lực và độ đặc hiệu cao đối với CD3, do đó có thể được sử dụng hữu hiệu trong phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.



CD3

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng cụm biệt hóa 3 (CD3-cluster of differentiation 3) và được phẩm chứa kháng thể này để điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các nguyên nhân gây tử vong, tử vong do bệnh ung thư xảy ra thường xuyên, chiếm tỷ lệ lớn thứ hai. Nhiều nỗ lực đã được thực hiện để điều trị bệnh ung thư trong quá khứ. Hiện nay, phương pháp sử dụng được chất chống ung thư, phương pháp xạ trị hoặc phương pháp phẫu thuật đã được thực hiện để điều trị bệnh ung thư. Tuy nhiên, các phương pháp điều trị này chỉ có thể có hiệu quả đối với bệnh ung thư ở giai đoạn đầu và có hiệu quả điều trị kém đối với bệnh ung thư ở giai đoạn cuối, khi bệnh ung thư đã lan sang các mô khác, hoặc khi bệnh ung thư đã tái phát.

Trong những năm gần đây, phương pháp điều trị miễn dịch tế bào nuôi dưỡng trong đó bệnh ung thư được điều trị bằng cách nuôi cấy lượng lớn *in vitro* tế bào lympho được lấy từ máu ngoại vi của đối tượng bị bệnh, sau đó cấy ghép trở lại tế bào lympho đã được nuôi cấy vào đối tượng bị bệnh, đã được nghiên cứu. Hơn nữa, một phương pháp cũng đang được phát triển trong đó các tế bào T độc tính đặc hiệu với các tế bào ung thư được tạo ra để loại bỏ tế bào ung thư bằng cách nuôi cấy tăng sinh lượng lớn *in vitro* các tế bào miễn dịch được lấy từ máu ngoại vi của đối tượng bị bệnh, xử lý các tế bào miễn dịch đã được nuôi cấy tăng sinh với các kháng nguyên, như các chất phân giải tế bào ung thư để hoạt hóa các tế bào miễn dịch, sau đó cho đối tượng bị bệnh sử dụng lại các tế bào miễn dịch thu được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được tạo ra để khắc phục các nhược điểm nêu trên. Theo một mục đích, sáng chế đề cập đến kháng thể có ái lực gắn kết cao với CD3 và được phẩm có hoạt lực điều trị bệnh ung thư rất cao chứa kháng thể này.

Tuy nhiên, nhược điểm được khắc phục bởi sáng chế không chỉ giới hạn ở các nhược điểm nêu trên, và các nhược điểm khác không được bộc lộ sẽ được hiểu dễ dàng

bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này từ phần mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể, chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) cấu thành từ trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.15, hoặc SEQ ID NO.16 và miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) cấu thành từ trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ SEQ ID NO.18 đến SEQ ID NO.25.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) của kháng thể nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa polynucleotit nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh chức năng của nó.

Do có ái lực và độ đặc hiệu cao với CD3, nên kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng hữu hiệu để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.

Cần hiểu rằng hiệu quả của sáng chế không chỉ giới hạn ở các hiệu quả nêu trên, và bao gồm toàn bộ các hiệu quả có thể được suy ra từ nội dung của sáng chế được mô tả trong phần Mô tả chi tiết sáng chế hoặc bộ yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện các kết quả thu được bằng cách phân tích ái lực gắn kết với các tế bào T của người của các kháng thể theo một phương án của sáng chế.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện các kết quả thu được bằng cách phân tích ái lực gắn kết với các tế bào T của khỉ của các kháng thể theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết trong phần mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) cấu thành từ trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.15, hoặc SEQ ID NO.16 và miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) cấu thành từ trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80% so với trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ SEQ ID NO.18 đến SEQ ID NO.25.

Miền biến đổi chuỗi nhẹ theo sáng chế có thể cấu thành từ trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, và tốt nhất nếu ít nhất bằng 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.15, hoặc SEQ ID NO.16.

Ngoài ra, miền biến đổi chuỗi nặng theo sáng chế có thể cấu thành từ trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, và tốt nhất nếu ít nhất bằng 99% so với trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ SEQ ID NO.18 đến SEQ ID NO.25.

Kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng theo sáng chế có thể gắn kết đặc hiệu với cụm biệt hóa 3 (CD3). Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng phản ứng chéo với CD3 của người và CD3 của khỉ. Tức là, CD3 có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CD3 có nguồn gốc từ người và CD3 có nguồn gốc từ khỉ.

Thuật ngữ “CD3” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chính cụm biệt hóa 3 (CD3), và biến thể, isotyp, và gen bản sao bất kỳ của nó, có trong động vật, tốt hơn nếu có trong người và khỉ. Ngoài ra, thuật ngữ “CD3 của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ CD3 có nguồn gốc từ người. Thuật ngữ “CD3 của khỉ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ CD3 có nguồn gốc từ khỉ.

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử globulin miễn dịch (Ig) phản ứng miễn dịch với kháng nguyên đặc hiệu, tức là phân tử protein đóng vai trò là thụ thể nhận diện đặc hiệu kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể toàn phần hoặc mảnh kháng thể.

Trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng theo sáng chế, một số

axit amin có thể được thay thế, chèn thêm, và/hoặc loại bỏ miễn là các đặc tính phù hợp với mục đích của sáng chế, như ái lực và độ đặc hiệu với CD3, được duy trì. Ví dụ, các gốc thay thế axit amin bảo thủ có thể xuất hiện trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc miền biến đổi chuỗi nặng. Gốc thay thế bảo thủ có nghĩa là thay thế trình tự axit amin ban đầu bằng một gốc axit amin khác có đặc tính tương tự.

Ví dụ, lysin, arginin, và histidin có cùng đặc tính là có chuỗi bên có tính bazơ, và axit aspartic và axit glutamic có cùng đặc tính là có chuỗi bên có tính axit. Ngoài ra, glycin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein, và tryptophan có cùng đặc tính là có chuỗi bên phân cực không mang điện; alanin, valin, leucin, threonin, isoleucin, prolin, phenylalanin, và metionin có cùng đặc tính là có chuỗi bên không phân cực; và tyrosin, phenylalanin, tryptophan, và histidin có cùng đặc tính là có chuỗi bên thơm.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các gốc thay thế axit amin bên trong nhóm các axit amin có cùng đặc tính như mô tả nêu trên sẽ không làm thay đổi đáng kể đặc tính. Do đó, các kháng thể đã được biến đổi bằng gốc thay thế bảo thủ bên trong miền biến đổi cũng nằm trong phạm vi của sáng chế miễn là các kháng thể này vẫn có đặc tính của kháng thể theo sáng chế.

Mặt khác, kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết đặc hiệu với tế bào T, đặc biệt là gắn kết đặc hiệu với bề mặt của tế bào T, thông qua gắn kết đặc hiệu với CD3. Tế bào T theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào T có nguồn gốc từ người và tế bào T có nguồn gốc từ khỉ.

Tức là, khi kháng thể có mặt trong cơ thể, kháng thể này có thể thu hút tế bào T thông qua gắn kết đặc hiệu với CD3. Theo đó, tế bào T được thu hút có thể gây ra các đáp ứng miễn dịch trong vùng lân cận của nó, và có thể tiếp tục tấn công khối u, như tế bào ung thư, và các tế bào tương tự.

Miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có thể cấu thành từ các vùng xác định bổ sung (CDR-complementarity determining region) và các vùng khung (FR-framework region). Thông thường, các vùng CDR tạo ra gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên đặc hiệu, và các vùng FR có chức năng tạo ra cấu trúc gấp nếp của kháng thể, để hỗ trợ gắn kết của các vùng CDR, hoặc các vùng tương tự.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể vẫn giữ lại các vùng CDR của kháng

thể kháng CD3 của chuột nhắt đã biết, tức là kháng thể SP34, trong đó các axit amin của miền hằng định (Fc) và các vùng FR của miền biến đổi của kháng thể SP34 được thay thế một phần hoặc hoàn toàn bằng các axit amin của người.

Kháng thể theo sáng chế có thể chứa chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29; chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.30; chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.31; chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32; chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.33; và chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34.

Theo đó, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể nhân tạo gắn kết đặc hiệu với CD3 của người. Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thể khảm chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của kháng thể không phải của người, như kháng thể của chuột nhắt, và có thể là kháng thể trong đó toàn bộ các đoạn ngoại trừ trình tự tương ứng với vùng siêu biến đổi được thay thế bằng các đoạn của người.

Ngoài ra, thuật ngữ “vùng siêu biến đổi” hoặc “HVR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng của miền biến đổi có khả năng siêu biến đổi hoặc tạo thành vòng lặp có cấu trúc xác định trong trình tự của kháng thể. Trong số các thuật ngữ xác định cùng đối tượng, thì thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” được đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat được sử dụng phổ biến nhất để phân loại các vùng dựa trên khả năng biến đổi của trình tự.

Đối với kháng thể, mảnh kháng thể của nó cũng có thể được sử dụng miễn là mảnh kháng thể này vẫn có chức năng của kháng thể. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể của nó có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể chứa mảnh globulin miễn dịch đime, kháng thể chứa mảnh globulin miễn dịch trime, kháng thể chứa mảnh globulin miễn dịch tetrame, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, mảnh Fd, mảnh scFv, kháng thể miền, kháng thể kích cỡ nhỏ, mảnh scAb, kháng thể IgD, kháng thể IgE, kháng thể IgM, kháng thể IgG1, kháng thể IgG2, kháng thể IgG3, kháng thể IgG4, dẫn xuất của miền hằng định của kháng thể, kháng thể nhân tạo dựa trên khung protein, và các kháng thể tương tự, vẫn có hoạt tính gắn kết với CD3.

Trong khi đó, kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng ở dạng thể tiếp hợp kháng thể-dược chất được điều chế bằng cách gắn kết kháng thể với dược chất chống ung thư có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào khối u. Thuật ngữ “chống ung thư” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp “phòng ngừa bệnh ung thư” và “điều trị bệnh ung thư”, và thuật ngữ “phòng ngừa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp bất kỳ ức chế hoặc làm chậm bệnh ung thư. Ngoài ra, thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp bất kỳ cải thiện hoặc biến đổi có lợi các triệu chứng của bệnh ung thư.

Dược chất có thể được sử dụng trong thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế bao gồm hợp chất bất kỳ có có hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm tế bào, và một đoạn hoặc nhóm chức của dược chất này. Ví dụ về dược chất bao gồm dược chất ức chế hình thành vi cấu trúc hình ống, dược chất ức chế phân bào, dược chất ức chế ARN polymeraza, dược chất ức chế topoisomeraza, dược chất cài xen ADN, dược chất alkyl hóa ADN, dược chất ức chế ribosom, ARN siêu nhỏ, ARN kẹp tóc mạch ngắn, ARN can thiệp mạch ngắn, đồng vị phóng xạ, và độc tố, trong số các hợp chất này ít nhất một hợp chất có thể được sử dụng.

Dược chất có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, maytansinoid, auristatin, dolastatin, trichothecene, CC1065 (NSC 298223), calicheamicin, taxane, anthracyclin, methotrexate, adriamycin, vindesin, alkaloid dừa cạn (vincristin, vinblastin, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin, daunomycin, etoposide, teniposide, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomycin, bleomycin, esperamicin, các kháng sinh enediyne khác, 5-fluoracil, các mù tạc nitơ khác và chất đồng phân lập thể, chất đẳng vị, chất tương tự, hoặc dẫn xuất của chúng, cis-platin và chất tương tự cis-platin, các enzym cài xen khác và mảnh chức năng của chúng, ví dụ nucleaza, kháng sinh, độc tố (độc tố có hoạt tính enzym hoặc độc tố phân tử nhỏ có nguồn gốc vi khuẩn, vi nấm, thực vật, hoặc động vật), và các dược chất chống khối u hoặc chống ung thư khác nhau, như cisplatin, CPT-11, paclitaxel, và docetaxel.

Ngoài ra, đồng vị phóng xạ (nuclit phóng xạ) bao gồm ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , và các đồng vị phóng xạ tương tự. ARN siêu nhỏ, ARN can thiệp mạch ngắn, ARN kẹp tóc mạch ngắn, và các ARN tương tự cũng có thể được sử dụng có thể ức chế biểu hiện một số gen gây ung thư.

Tốt hơn nếu gắn kết của kháng thể kháng CD3 với được chất được tạo ra bằng phản ứng tiếp hợp bằng cách sử dụng nhóm chức, như nhóm thiol của gốc axit amin, như lysin hoặc xystein trong kháng thể. Khi cần, cũng có thể thực hiện phản ứng tiếp hợp ở dạng được điều hòa bởi gốc liên kết thường được sử dụng. Gốc liên kết trên cơ sở maleimit hoặc iot axetamit cũng có thể được sử dụng.

Khi được chất được tiếp hợp với kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó, thì được chất có thể được tiếp hợp với đầu tận cùng C, đối diện với vị trí gắn kết kháng nguyên, dưới góc độ làm giảm ảnh hưởng đến khả năng gắn kết của kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó và độ đặc hiệu với CD3, và các đặc tính tương tự. Khi kháng thể toàn phần, thay vì mảnh chức năng của nó, được sử dụng, được chất có thể được tiếp hợp với vùng Fc.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm được chất trên cơ sở thụ thể kháng nguyên thể khảm chứa kháng thể này. Ví dụ về được chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, được chất trên cơ sở tế bào T thụ thể kháng nguyên thể khảm hoặc được chất trên cơ sở tế bào giết tự nhiên thụ thể kháng nguyên thể khảm.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng ở dạng kháng thể đặc hiệu kép chứa kháng thể kháng CD3. Kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể có khả năng gắn kết đồng thời với hai kháng nguyên, và có thể tồn tại ở dạng trong đó cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ gắn kết với các kháng nguyên khác nhau được liên kết với nhau.

Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép có thể tồn tại ở dạng, như kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu kép trong đó các mảnh kháng thể chuỗi đơn (scFv), trong đó VL và VH được liên kết với nhau thông qua gốc liên kết peptit mạch ngắn, được liên kết ở dạng scFv1-scFv2(-Fc), kháng thể đặc hiệu kép trên cơ sở kháng thể miền đơn (sdAb) bằng cách sử dụng VH, và kháng thể đặc hiệu kép được điều chế bằng phương pháp BiTE (xem <http://www.micromet.de>) do Micromet, Germany cung cấp.

Kháng thể đặc hiệu kép có thể tồn tại ở dạng trong đó kháng thể kháng CD3 được gắn kết với kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó có khả năng gắn kết với phân tử đích đặc hiệu tế bào miễn dịch. Phân tử đích đặc hiệu tế bào miễn dịch có thể được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, TCR/CD3, CD16 (FcγRIIIa), CD44, CD56, CD69, CD64 (FcγRI), CD89, và CD11b/CD18 (CR3).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) của kháng thể theo sáng chế và vector biểu hiện chứa polynucleotit này.

Polynucleotit mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh kháng thể của nó, tức là gen, có thể dễ dàng được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này từ trình tự axit amin của kháng thể kháng CD3.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vector tái tổ hợp có khả năng biểu hiện protein đích trong tế bào vật chủ, tức là gen cấu trúc chứa các đoạn điều hòa thiết yếu được liên kết điều khiển với nhau sao cho gen được chèn vào được biểu hiện. Gen mã hóa kháng thể kháng CD3 có thể được chèn vào vector riêng biệt hoặc có thể được sử dụng ở dạng được chèn vào cùng vector.

Cụ thể, polynucleotit mã hóa trình tự axit amin của kháng thể kháng CD3 có thể được sử dụng ở dạng được chèn vào vector riêng biệt hoặc cùng vector, và polynucleotit mã hóa chuỗi nặng hoặc miền biến đổi của nó có thể được sử dụng ở dạng được chèn vào vector riêng biệt hoặc cùng vector.

Thuật ngữ “được liên kết điều khiển” có nghĩa là trình tự điều hòa biểu hiện axit nucleic và trình tự axit nucleic mã hóa protein mong muốn được liên kết chức năng để thực hiện chức năng mong muốn. Liên kết điều khiển với vector tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp gen đã biết trong lĩnh vực này, và phân cắt và nối ADN đặc hiệu vị trí có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách sử dụng enzym và các chất tương tự đã biết trong lĩnh vực này.

Vector biểu hiện thích hợp để sản xuất kháng thể kháng CD3 có thể chứa các trình tự tín hiệu để hướng đích màng hoặc bài tiết cùng với các đoạn điều hòa biểu hiện, như vùng khởi đầu, bộ ba mã hóa khởi đầu, bộ ba mã hóa kết thúc, tín hiệu polyadenyl hóa, và vùng tăng cường. Bộ ba mã hóa khởi đầu và bộ ba mã hóa kết thúc thường được xem là một phần của trình tự nucleotit mã hóa protein đích miễn dịch. Các bộ ba mã hóa này phải có chức năng ở đối tượng khi gen cấu trúc được sử dụng và phải nằm trong khung với trình tự mã hóa. Nhìn chung, vùng khởi đầu có thể là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu cảm ứng. Vùng khởi đầu có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ, như lac, tac, T3, và T7, vùng khởi đầu của virus gây

bệnh trên khỉ 40 (SV40), vùng khởi đầu của virus gây khối u vú ở chuột nhắt (MMTV), vùng khởi đầu của virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch ở người (HIV), ví dụ vùng khởi đầu lặp lại tận cùng mạch dài (LTR) của HIV, vùng khởi đầu của virus Moloney, vùng khởi đầu của virus cytomegalo (CMV), vùng khởi đầu của virus Epstein bar (EBV), vùng khởi đầu của virus Rous sarcoma (RSV), cũng như vùng khởi đầu β -actin, vùng khởi đầu mã hóa hemoglobin của người, vùng khởi đầu mã hóa creatin cơ của người, vùng khởi đầu nhân sơ có nguồn gốc từ metallothionein của người, và các vùng khởi đầu tương tự.

Vector biểu hiện có thể còn chứa gen chỉ thị có thể chọn lọc cho phép chọn lọc tế bào vật chủ chứa vector này. Gen chỉ thị có thể chọn lọc được sử dụng để chọn lọc tế bào được biến nạp với vector này. Đối với gen chỉ thị có thể chọn lọc, các gen chỉ thị có thể được sử dụng tạo ra kiểu hình có thể chọn lọc, như khả năng kháng dược chất, dị tăng trưởng, khả năng kháng dược chất gây độc tế bào, hoặc biểu hiện protein bề mặt. Trong môi trường được xử lý với chất chọn lọc, chỉ tế bào biểu hiện gen chỉ thị có thể chọn lọc sống sót, cho phép chọn lọc tế bào chuyển gen. Ngoài ra, khi vector này là vector biểu hiện có khả năng tái bản, thì vector này có thể chứa đoạn khởi đầu tái bản là trình tự axit nucleic đặc hiệu hoạt hóa quá trình tái bản.

Các dạng vector khác nhau, như plasmit, virus, và cosmit có thể được sử dụng làm vector biểu hiện tái tổ hợp để chèn gen ngoại sinh. Vector biểu hiện tái tổ hợp không bị giới hạn cụ thể miễn là vector này có chức năng biểu hiện gen mong muốn và sản sinh protein mong muốn trong các tế bào vật chủ khác nhau bao gồm tế bào nhân sơ và/hoặc tế bào nhân thật. Tốt hơn nếu vector này có thể là vector có khả năng sản sinh lượng lớn của protein ngoại sinh ở dạng tương tự như trạng thái tự nhiên của nó đồng thời có vùng khởi đầu có hoạt tính mạnh và khả năng biểu hiện mạnh.

Các tổ hợp vật chủ/vector biểu hiện khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện kháng thể kháng CD3. Vector biểu hiện thích hợp cho các vật chủ nhân thật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự điều hòa biểu hiện có nguồn gốc từ SV40, virus gây bệnh u nhú ở bò, virus adeno, virus có mối liên hệ di truyền với virus adeno, virus cytomegalo, và virus retro. Vector biểu hiện có thể được sử dụng trong các vật chủ vi khuẩn bao gồm plasmit vi khuẩn thu được từ *Escherichia coli*, như pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, vector pUC, colE1, pCR1, pBR322, pMB9, và dẫn xuất của chúng;

plasmid có phổ vật chủ rộng, như RP4; ADN thực khuẩn thể có thể là ví dụ về một loạt các dẫn xuất thực khuẩn thể lamda, như λ gt10, λ gt11, và NM989; và các thực khuẩn thể ADN khác, như M13 và thực khuẩn thể ADN sợi đơn dạng sợi. Vector biểu hiện hữu ích cho tế bào nấm men có thể bao gồm plasmid 2-micron và dẫn xuất của nó. Vector này hữu ích cho tế bào côn trùng có thể là pVL941.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ, được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế. Vector biểu hiện có thể được chèn vào tế bào vật chủ để tạo ra thể biến nạp. Tế bào vật chủ thích hợp cho vector này có thể bao gồm tế bào nhân sơ, như *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis*, hoặc *Staphylococcus sp.* Ngoài ra, tế bào vật chủ có thể bao gồm tế bào nhân thật bao gồm tế bào nhân thật bậc thấp từ vi nấm, như *Aspergillus sp.*, nấm men, như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp.*, và *Neurospora crassa*, và sinh vật nhân thật bậc thấp khác, và tế bào nhân thật bậc cao, như tế bào côn trùng. Ngoài ra, tế bào vật chủ cũng có thể có nguồn gốc từ thực vật hoặc động vật có vú. Tốt hơn nếu, tế bào vật chủ có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào thận khỉ (tế bào COS7), tế bào NSO (tế bào u tủy có nguồn gốc từ chuột nhắt), tế bào SP2/0 (tế bào u tủy có nguồn gốc từ chuột nhắt), các dòng tế bào u tủy khác, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO), tế bào W138 (dòng tế bào lưỡng bội của người), tế bào thận của chuột đồng mới sinh (tế bào BHK), MDCK, tế bào HuT 78, tế bào HEK293, và các tế bào tương tự, với tế bào CHO được ưu tiên.

Thuật ngữ “biến nạp vào tế bào vật chủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp bất kỳ để chèn axit nucleic vào sinh vật, tế bào, mô, hoặc cơ quan và, và quá trình biến nạp này có thể được thực hiện bằng phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này được chọn phụ thuộc vào loại tế bào vật chủ. Cụ thể, phương pháp xung điện, phương pháp dung hợp tế bào trần, phương pháp kết tủa bằng canxi phosphat, phương pháp kết tủa bằng canxi clorua, phương pháp khuấy trộn bằng cách sử dụng sợi silicon cacbua, phương pháp chuyển gen nhờ agrobacterium, phương pháp chuyển gen nhờ PEG, phương pháp chuyển gen nhờ dextran sulfat, phương pháp chuyển gen nhờ lipofectamin, phương pháp chuyển gen bằng cách sấy khô/ức chế, hoặc các phương pháp tương tự có thể được sử dụng. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể

gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ. Cụ thể, phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm các bước: chèn trình tự nucleotit mã hóa kháng thể kháng CD3 vào vector, để thiết kế vector tái tổ hợp; biến nạp vector tái tổ hợp thu được vào tế bào vật chủ và thực hiện nuôi cấy; và bước phân tách và tinh chế kháng thể nhân tạo từ thể biến nạp được nuôi cấy.

Kháng thể nhân tạo theo sáng chế có thể được sản xuất ở lượng lớn bằng cách nuôi cấy thể biến nạp, trong đó vector tái tổ hợp được biểu hiện, trong môi trường dinh dưỡng, và môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy có thể được chọn thích hợp từ môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực này phụ thuộc vào loại tế bào vật chủ. Trong quá trình nuôi cấy, các điều kiện, như nhiệt độ, độ pH của môi trường, và thời gian nuôi cấy có thể được điều chỉnh thích hợp để thích hợp cho quá trình sinh trưởng của tế bào và sản xuất lượng lớn protein.

Kháng thể kháng CD3 được sản xuất tái tổ hợp mô tả nêu trên có thể được thu nhận từ môi trường hoặc dịch phân giải tế bào. Khi kháng thể ở dạng gắn kết với màng, kháng thể này có thể được giải phóng khỏi màng bằng cách sử dụng dung dịch chứa chất hoạt động bề mặt thích hợp (ví dụ, Triton-X 100) hoặc bằng cách phân cắt bằng enzym. Các tế bào được sử dụng để biểu hiện kháng thể nhân tạo theo sáng chế có thể được phá vỡ bằng các phương pháp vật lý và hóa học khác nhau, như phương pháp lạnh đông-rã đông theo chu kỳ, phương pháp siêu âm, phương pháp phá vỡ cơ học, hoặc phương pháp sử dụng chất phân giải tế bào, và quá trình phân tách và tinh chế có thể được thực hiện bằng các phương pháp phân tách sinh hóa thông thường. Phương pháp phân tách sinh hóa có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp điện di, phương pháp ly tâm, phương pháp lọc gel, phương pháp kết tủa, phương pháp thẩm tách, phương pháp sắc ký (phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp sắc ký hấp thụ miễn dịch, phương pháp sắc ký hấp thụ loại cở, hoặc các phương pháp sắc ký tương tự), phương pháp tập trung đẳng điện, và các phương pháp tương tự.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, chứa kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh chức năng của nó.

Bệnh ung thư có thể được điều trị bằng dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm cả bệnh ung thư dạng khối u rắn và bệnh ung thư máu, và tốt hơn nếu có thể bao gồm

bệnh ung thư bất kỳ biểu hiện CD3. Kháng thể theo sáng chế có thể thu hút tế bào T thông qua gắn kết đặc hiệu với CD3, và do đó gây chết tế bào ung thư.

Cụ thể, bệnh ung thư có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư da, bệnh ung thư biểu mô, bệnh ung thư não, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, hoặc bệnh ung thư buồng trứng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất mang dược dụng. Tá dược dính, tá dược gây trượt, tá dược rã, tá dược, chất hòa tan, tá dược phân tán, chất ổn định, chất gây thấm ổn định, chất màu, chất thơm, và các chất mang tương tự có thể được sử dụng làm chất mang dược dụng để sử dụng qua đường miệng; tá dược đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, chất hòa tan, chất đẳng trương, chất ổn định, và các chất mang tương tự có thể được sử dụng trong hỗn hợp để tiêm; và chất nền, tá dược, tá dược trơn, chất bảo quản, và các chất mang tương tự có thể được sử dụng để sử dụng qua đường khu trú.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo các phương pháp khác nhau bằng cách trộn với chất mang dược dụng mô tả nêu trên. Ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng viên nén, viên ngậm, viên nang, cốm thuốc, hỗn dịch, xi-rô, viên nhện, hoặc các dạng bào chế tương tự. Để sử dụng qua đường tiêm, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng ống tiêm đơn liều hoặc dạng bào chế đa liều.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất hoạt động bề mặt có thể tăng cường tính thấm màng. Chất hoạt động bề mặt này có thể là có nguồn gốc từ steroid hoặc có thể bao gồm lipid dạng cation, như N-[1-(2,3-dioleoyl)propyl-N,N,N-trimethylamoni clorua (DOTMA), hoặc các hợp chất khác nhau, như cholesterol hemisuccinat và phosphatidyl glycerol, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất hoạt động bề mặt này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư hoặc ức chế sinh trưởng của tế bào ung thư, bao gồm bước sử dụng dược phẩm theo sáng chế cho đối tượng. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD3 có thể được sử dụng ở lượng hữu hiệu để điều trị tế bào ung thư hoặc tình trạng di căn của tế bào ung thư hoặc ức chế sinh trưởng của tế

bào ung thư. Lượng hữu hiệu có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, như loại bệnh ung thư, độ tuổi, cân nặng của đối tượng bị bệnh, bản chất và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng, loại phương pháp điều trị đang được sử dụng, số lần điều trị, dạng bào chế, và đường đưa thuốc, và có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời hoặc luân phiên với các thành phần dược lý hoặc dược học nêu trên, và cũng có thể được sử dụng kết hợp với dược chất thông thường khác, trong trường hợp này dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời hoặc luân phiên với dược chất thông thường. Quá trình sử dụng này có thể được thực hiện một lần hoặc nhiều lần. Cân nhắc toàn bộ các yếu tố nêu trên, điều quan trọng là lượng dược sử dụng là lượng tối thiểu và cho phép thu được hiệu quả tối đa mà không gây ra các tác dụng không mong muốn, và lượng này có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ động vật có vú, tốt hơn nếu người, bị hoặc có nguy cơ bị bệnh hoặc tình trạng bệnh có thể được làm giảm, ức chế hoặc điều trị bằng cách sử dụng dược phẩm.

Thuật ngữ “sử dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp đưa hợp chất xác định trước vào đối tượng theo cách thức thích hợp, và dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng thông qua đường đưa thuốc bất kỳ miễn là đường đưa thuốc này cho phép dược phẩm đạt được đến mô đích. Phương pháp sử dụng này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sử dụng qua đường tiêm màng bụng, sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, sử dụng qua đường tiêm bắp, sử dụng qua đường tiêm dưới da, sử dụng qua đường tiêm trong da, sử dụng qua đường miệng, sử dụng qua đường khu trú, hoặc sử dụng qua đường trong mũi, hoặc sử dụng qua đường hô hấp, hoặc sử dụng qua đường trực tràng. Theo sáng chế, trong trường hợp sử dụng qua đường miệng, dưới góc độ các protein được phân giải, tốt hơn nếu dược phẩm theo sáng chế được bào chế để sử dụng qua đường miệng sao cho dược chất được bao hoặc dược phẩm được bảo vệ khỏi phân giải trong dạ dày. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng thiết bị bất kỳ sao cho hoạt chất có thể di chuyển được đến tế bào đích của nó.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để phòng ngừa hoặc

điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để sản xuất thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, bao gồm bước sử dụng kháng thể theo sáng chế cho đối tượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế, chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Sản xuất kháng thể nhân tạo kháng CD3

Ví dụ 1.1. Chọn lọc các kháng thể để nhân tạo hóa

Các trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) của kháng thể SP34 của chuột nhắt, được gọi là kháng thể kháng CD3, được nhập vào cơ sở dữ liệu mạng (IgBLAST), sau đó các trình tự kháng thể phôi của người có độ tương đồng cao nhất được tra cứu. Kết quả là, độ tương đồng trình tự axit amin cao nhất được thể hiện giữa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể SP34 của chuột nhắt và *Homo sapiens* IGLV7-46*01 (tên gen IMGT), và giữa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể SP34 của chuột nhắt và *Homo sapiens* IGHV3-73*02 (tên gen IMGT).

Ví dụ 1.2. Nhân tạo hóa chuỗi nhẹ miền biến đổi

Trình tự axit amin CDR của *Homo sapiens* IGLV7-46*01 (tên gen IMGT), kháng thể phôi của người có độ tương đồng trình tự cao nhất so với miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể SP34, được thay thế bằng trình tự CDR của kháng thể SP34 của chuột nhắt, để thu được miền biến đổi chuỗi nhẹ nhân tạo một phần của kháng thể SP34.

Để tăng cường đặc tính gắn kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nhẹ nhân tạo một phần của kháng thể SP34, các gốc axit amin trong các trình tự vùng khung (FR) được cho là có chức năng quan trọng trong đặc tính gắn kết kháng nguyên được thay thế bằng các gốc axit amin tương tự như kháng thể SP34 của chuột nhắt. Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ nhân tạo của kháng thể SP34 thu được được thể hiện trong Bảng 1.

Như được thể hiện trên Bảng 1, các gốc cải biến ngẫu nhiên được tạo ra đối với các gốc axit amin 38, 48, 51, và 71 của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể SP34 của chuột nhắt, để thu được tổng số 16 miền biến đổi chuỗi nhẹ nhân tạo của kháng thể SP34. Theo sáng chế, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể SP34 của chuột nhắt được sử dụng làm mẫu đối chứng để so sánh ái lực với kháng nguyên CD3.

Bảng 1

Dòng	Miền biến đổi	Trình tự axit amin (Các đoạn in đậm thể hiện CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nhẹ theo thứ tự)	SEQ ID NO.
01	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	1
02	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	2
03	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL GGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	3
04	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL GGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	4
05	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	5
06	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	6
07	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGL GGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	7
08	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGL GGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	8
09	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	9
10	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	10
11	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL GGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	11
12	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTL GGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	12
13	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	13
14	Chuỗi	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGL YGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF	14

	nhẹ	GGGTKLTVLG	
15	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	15
16	Chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	16
SP34	Chuỗi nhẹ	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHFLTGLI GGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVLG	17

Ví dụ 1.3. Nhân tạo hóa miền biến đổi chuỗi nặng

Trình tự axit amin CDR của *Homo sapiens* IGLV3-73*02 (tên gen IMGT), kháng thể phôi của người có độ tương đồng trình tự cao nhất so với miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể SP34, được thay thế bằng trình tự CDR của kháng thể SP34 của chuột nhắt, để thu được miền biến đổi chuỗi nặng nhân tạo một phần của kháng thể SP34.

Để tăng cường đặc tính gắn kết kháng nguyên của miền biến đổi chuỗi nặng nhân tạo một phần của kháng thể SP34, các gốc axit amin trong các trình tự vùng khung (FR) được cho là có chức năng quan trọng trong đặc tính gắn kết kháng nguyên được thay thế bằng các gốc axit amin tương tự như kháng thể SP34 của chuột nhắt. Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng nhân tạo của kháng thể SP34 thu được được thể hiện trong Bảng 2.

Như được thể hiện trên Bảng 2, các gốc cải biến ngẫu nhiên được tạo ra đối với các gốc axit amin 49, 78, 79, và 81 của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể SP34 của chuột nhắt, để thu được tổng số 8 miền biến đổi chuỗi nặng nhân tạo của kháng thể SP34. Theo sáng chế, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể SP34 của chuột nhắt được sử dụng làm mẫu đối chứng để so sánh ái lực với kháng nguyên CD3.

Bảng 2

Dòng	Miền biến đổi	Trình tự axit amin (Các đoạn in đậm thể hiện CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng theo thứ tự)	SEQ ID NO.
A	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFTNTYAM NWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	18
B	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFTNTYAM NWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	19
C	Chuỗi	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFTNTYAM NWVRQASGKGLEWVGR	20

	nặng	IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
D	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	21
E	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	22
F	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	23
G	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	24
H	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	25
SP34	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	26

Ví dụ 1.4. Tách dòng kháng thể nhân tạo kháng CD3

Mỗi gen mã hóa 16 các miền biến đổi chuỗi nhẹ thu được nêu trên được chèn vào vector biểu hiện tế bào động vật pcDNA3.4 chứa miền hằng định chuỗi nhẹ lamda (λ -CL), và mỗi gen mã hóa 8 miền biến đổi chuỗi nặng được chèn vào vector biểu hiện tế bào động vật pcDNA3.4 chứa các miền hằng định IgG1 (CH1, vùng bản lề, CH2, CH3).

Các trình tự axit amin đặc hiệu tương ứng của miền hằng định chuỗi nhẹ lamda và miền hằng định chuỗi nặng IgG1 được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Dòng	Miền hằng định	Trình tự axit amin	SEQ ID NO.
λ	Chuỗi nhẹ	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	27
IgG1	Chuỗi nặng	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	28

Ví dụ 1.5. Chuyển nạp kháng thể nhân tạo kháng CD3

Hai mươi bốn giờ trước khi chuyển nạp, các tế bào Expi293F ở mật độ bằng $2,0 \times$

10^6 tế bào/mL được cấy chuyển với môi trường Expi293 ở tốc độ bằng 125 ± 10 vòng/phút trong thiết bị ủ lắc ở điều kiện nhiệt độ 37°C và 8% CO_2 . Khi quá trình chuyển nạp được thực hiện, số lượng tế bào và khả năng sống sót của tế bào được đánh giá để xác định xem khả năng sống sót của tế bào có bằng 95% hoặc cao hơn hay không.

Các tế bào được phân tán ở mật độ bằng $7,5 \times 10^7$ tế bào trong bình nuôi cấy dung tích 125 mL, sau đó môi trường Expi293 được bổ sung vào để điều chỉnh đến thể tích cuối cùng bằng 25 mL (trên cơ sở thể tích 30 mL). Bằng cách sử dụng môi trường Opti-MEM I, vector biểu hiện kháng thể (30 μg) được trộn với tổng số 1,5mL và quá trình ủ được thực hiện trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Đối với các vector kháng thể, tổng số 128 kháng thể SP34 IgG1 nhân tạo, được điều chế bằng tổ hợp của các vector biểu hiện đối với 8 miền biến đổi chuỗi nặng và các vector biểu hiện đối với 16 các miền biến đổi chuỗi nhẹ, được sử dụng. Kháng thể SP34 IgG1 thể khảm chuột nhất/người được sử dụng làm vector kháng thể đối chứng. Các tổ hợp kháng thể đặc hiệu được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Dòng		Chuỗi nặng (VH)							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Chuỗi nhẹ (VL)	01	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
	02	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
	03	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
	04	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
	05	A05	B05	C05	D05	E05	F05	G05	H05
	06	A06	B06	C06	D06	E06	F06	G06	H06
	07	A07	B07	C07	D07	E07	F07	G07	H07
	08	A08	B08	C08	D08	E08	F08	G08	H08
	09	A09	B09	C09	D09	E09	F09	G09	H09
	10	A10	B10	C10	D10	E10	F10	G10	H10
	11	A11	B11	C11	D11	E11	F11	G11	H11
	12	A12	B12	C12	D12	E12	F12	G12	H12
	13	A13	B13	C13	D13	E13	F13	G13	H13
	14	A14	B14	C14	D14	E14	F14	G14	H14
	15	A15	B15	C15	D15	E15	F15	G15	H15
	16	A16	B16	C16	D16	E16	F16	G16	H16

Bằng cách sử dụng môi trường Opti-MEM I, chất phản ứng chuyển nạp (80 μL) được trộn với tổng số 1,5mL, và quá trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Các môi trường Opti-MEM I tương ứng chứa vector và chất phản ứng chuyển nạp được trộn từ từ và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau đó, hỗn hợp thu được được nạp vào bình chứa các tế bào Expi293F. Quá trình ủ được thực hiện ở tốc độ bằng $125 \pm$

10 vòng/phút trong 16 đến 20 giờ trong thiết bị ủ lắc ở điều kiện nhiệt độ 37°C và 8% CO₂. Sau đó, môi trường tăng cường chuyển nạp I (1,5mL) và môi trường tăng cường chuyển nạp II (150µL) được bổ sung vào, và quá trình ủ được thực hiện trong 6 ngày để thu được các kháng thể mong muốn.

Ví dụ 1.6. Tinh chế các kháng thể

Hỗn hợp ủ được ly tâm ở tốc độ bằng 4000 vòng/phút trong 30 phút, lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,22µm, sau đó các mảnh tế bào được loại bỏ để thu được dịch nổi. Nhựa Mabselect Xtra (0,2mL) được bổ sung vào cột, và quá trình cân bằng được thực hiện bằng dung dịch đệm gắn kết protein A ở thể tích gấp 10 lần thể tích nhựa

Sau đó, dịch nổi được nạp vào cột bằng trọng lực. Sau khi quá trình nạp kết thúc, cột được rửa bằng dung dịch đệm gắn kết protein A ở thể tích gấp 10 lần thể tích nhựa

Sau đó, dung dịch đệm rửa giải IgG được bổ sung vào cột và quá trình rửa giải được thực hiện. Sản phẩm rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung Tris-Cl 1,5M (25µL/1mL sản phẩm rửa giải). Sau đó, nồng độ sản phẩm rửa giải được đo bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 280nm. Sản phẩm rửa giải có nồng độ đã được đo được trao đổi với dung dịch đệm PBS bằng phương pháp thẩm tách.

Ví dụ 2. Chọn lọc các kháng thể nhân tạo kháng CD3

Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) được sử dụng để chọn lọc các kháng thể có ái lực với CD3 của người và CD3 của khỉ trong tổng số 128 tổ hợp kháng thể kháng CD3 (SP34).

Cụ thể, heterodime CD3ε/δ tái tổ hợp của người hoặc CD3ε/δ tái tổ hợp của khỉ đuôi dài được pha loãng trong dung dịch đệm phủ và sử dụng để xử lý đĩa 96 giếng. Đĩa được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Sau đó, dung dịch đệm được loại bỏ và quá trình xử lý bằng dung dịch albumin huyết thanh bò/PBS 1% được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch này được loại bỏ. Sau đó, các tế bào được phủ bằng CD3 tái tổ hợp được xử lý với các dung dịch nuôi cấy biểu hiện kháng thể trong khoảng 1 giờ.

Các giếng được rửa bằng dung dịch Tween 20/PBS 0,05%, sau đó quá trình xử lý bằng kháng thể IgG của người được tiếp hợp với peroxidaza của cải ngựa, đã được pha

loãng trong dung dịch BSA/PBS 1%, được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch này được loại bỏ và các giếng được rửa bằng dung dịch Tween 20/PBS 0,05%.

Dung dịch TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) được sử dụng để xử lý đĩa 96 giếng, và đĩa 96 giếng này được để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, quá trình xử lý bằng dung dịch dừng phản ứng được thực hiện, và mức độ khai triển màu sắc được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 450nm. Trong số các kháng thể nhân tạo SP34 thu được, chỉ các mẫu đã khai triển màu sắc là các dòng vẫn có ái lực với CD3 của kháng thể SP34 của chuột nhất kháng thể. Các kết quả đặc hiệu thu được bằng cách đo ái lực được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Dòng	Độ hấp thụ (450 nm)			Dòng	Độ hấp thụ (450 nm)		
	BSA	CD3 của người	CD3 của khí đuôi dài		BSA	CD3 của người	CD3 của khí đuôi dài
A01	0,107	0,152	0,098	E01	0,078	0,100	0,078
A02	0,071	0,098	0,068	E02	0,077	0,095	0,070
A03	0,092	0,132	0,094	E03	0,098	0,134	0,076
A04	0,063	0,098	0,065	E04	0,080	0,087	0,067
A05	0,152	0,167	0,141	E05	0,083	0,085	0,068
A06	0,084	0,140	0,108	E06	0,206	0,112	0,086
A07	0,089	1,315	2,546	E07	0,097	0,109	0,115
A08	0,094	0,875	2,339	E08	0,106	0,074	0,099
A09	0,061	0,092	0,050	E09	0,072	0,096	0,084
A10	0,077	0,097	0,066	E10	0,064	0,083	0,065
A11	0,072	0,122	0,105	E11	0,065	0,098	0,075
A12	0,060	0,097	0,068	E12	0,059	0,088	0,064
A13	0,098	0,172	0,154	E13	0,085	0,139	0,114
A14	0,082	0,125	0,113	E14	0,068	0,105	0,078
A15	0,099	2,785	2,864	E15	0,130	2,411	2,702
A16	0,068	2,538	2,799	E16	0,089	2,399	2,736
B01	0,055	0,097	0,071	F01	0,084	0,118	0,086
B02	0,059	0,086	0,072	F02	0,062	0,093	0,076
B03	0,071	0,126	0,091	F03	0,078	0,128	0,101
B04	0,053	0,087	0,059	F04	0,057	0,084	0,069
B05	0,069	0,102	0,100	F05	0,066	0,105	0,075
B06	0,077	0,138	0,143	F06	0,079	0,115	0,096
B07	0,061	0,718	2,449	F07	0,142	0,133	0,163
B08	0,060	0,424	2,193	F08	0,076	0,134	0,180
B09	0,063	0,096	0,099	F09	0,071	0,099	0,084
B10	0,078	0,098	0,076	F10	0,068	0,118	0,091
B11	0,074	0,132	0,107	F11	0,071	0,138	0,104
B12	0,059	0,098	0,072	F12	0,090	0,090	0,077
B13	0,130	0,169	0,156	F13	0,076	0,192	0,151

B14	0,078	0,127	0,102	F14	0,071	0,114	0,100
B15	0,204	2,709	3,161	F15	0,081	2,489	2,755
B16	0,064	2,370	2,926	F16	0,066	2,455	2,855
C01	0,128	0,131	0,075	G01	0,080	0,113	0,096
C02	0,108	0,099	0,071	G02	0,075	0,146	0,069
C03	0,126	0,140	0,089	G03	0,078	0,098	0,088
C04	0,073	0,093	0,067	G04	0,067	0,129	0,063
C05	0,099	0,107	0,128	G05	0,079	0,109	0,072
C06	0,080	0,108	0,083	G06	0,095	0,118	0,078
C07	0,113	0,960	2,604	G07	0,077	0,118	0,316
C08	0,111	0,446	2,178	G08	0,148	0,137	0,119
C09	0,083	0,109	0,075	G09	0,083	0,106	0,079
C10	0,066	0,096	0,074	G10	0,072	0,099	0,079
C11	0,168	0,288	0,261	G11	0,086	0,104	0,080
C12	0,065	0,087	0,065	G12	0,057	0,085	0,065
C13	0,128	0,179	0,179	G13	0,132	0,265	0,242
C14	0,075	0,107	0,095	G14	0,075	0,105	0,099
C15	0,098	2,454	2,813	G15	0,091	2,415	2,694
C16	0,092	2,369	2,802	G16	0,108	2,482	2,773
D01	0,124	0,136	0,099	H01	0,087	0,121	0,154
D02	0,056	0,150	0,073	H02	0,125	0,111	0,080
D03	0,073	0,159	0,130	H03	0,068	0,113	0,085
D04	0,083	0,091	0,072	H04	0,055	0,077	0,068
D05	0,061	0,121	0,101	H05	0,059	0,078	0,061
D06	0,092	0,136	0,110	H06	0,086	0,134	0,101
D07	0,074	1,168	2,393	H07	0,060	0,110	0,090
D08	0,083	0,897	2,532	H08	0,091	0,118	0,136
D09	0,083	0,122	0,098	H09	0,085	0,141	0,113
D10	0,076	0,117	0,113	H10	0,055	0,088	0,077
D11	0,105	0,138	0,134	H11	0,083	0,122	0,142
D12	0,081	0,095	0,114	H12	0,060	0,099	0,083
D13	0,314	0,569	0,532	H13	0,083	0,175	0,196
D14	0,121	0,149	0,113	H14	0,064	0,096	0,094
D15	0,108	2,529	3,006	H15	0,067	2,436	2,836
D16	0,080	2,655	2,872	H16	0,080	2,461	2,873

Các kết quả thử nghiệm trên Bảng 5 cho thấy rằng 24 dòng, A7, A8, A15, A16, B7, B8, B15, B16, C7, C8, C15, C16, D7, D8, D15, D16, E15, E16, F15, F16, G15, G16, H15, và H16, vẫn có ái lực với CD3 của người và CD3 của khỉ. Do đó, 24 dòng này được chọn lọc làm các kháng thể nhân tạo kháng CD3 (SP34).

Ví dụ 3. Đo ái lực với CD3 tái tổ hợp của các kháng thể nhân tạo kháng CD3

Hệ Octet được sử dụng để đo ái lực với CD3 tái tổ hợp của các kháng thể nhân tạo kháng CD3 (SP34) được chọn lọc theo ví dụ 2. Cụ thể, CD3 ϵ/δ tái tổ hợp của người hoặc CD3 ϵ/δ tái tổ hợp của khỉ đuôi dài được điều chế ở nồng độ bằng 5 μ g/mL trong dung dịch đệm động học 1 $\times$ và sử dụng để xử lý đĩa 96 giếng ở nồng độ bằng 200 μ L/giếng. Sau khi xử lý, CD3 ϵ/δ được cố định vào cảm biến kháng Penta His (HIS1K, mã sản phẩm

18-5121, Fortebio). Các dòng có ái lực gắn kết với CD3ε/δ tái tổ hợp của người hoặc CD3ε/δ tái tổ hợp của khỉ đuôi dài theo kết quả thử nghiệm ELISA được điều chế ở nồng độ bằng 50nM trong dung dịch đệm động học 1×, và quá trình xử lý bằng dung dịch đệm động học này được thực hiện ở nồng độ bằng 200μL/giếng. Dung dịch đệm động học 1× được điều chế bằng cách pha loãng dung dịch đệm động học 10× (ForteBio, mã sản phẩm số 18-1092) 10 lần bằng dung dịch PBS và sử dụng. Tương tác giữa CD3ε/δ được cố định vào cảm biến và kháng thể ở nồng độ bằng 50nM được phân tích để tính toán ái lực kháng nguyên-kháng thể, và các kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Ag	CD3ε/δ tái tổ hợp của người			CD3ε/δ tái tổ hợp của khỉ đuôi dài		
Dòng	K _D (M)	k _{on} (1/mili giây)	k _{dis} (1/giây)	K _D (M)	k _{on} (1/mili giây)	k _{dis} (1/giây)
cSP34	2,29x10 ⁻¹⁰	2,62x10 ⁵	6,01x10 ⁻⁰⁵	1,40x10 ⁻¹⁰	3,78x10 ⁵	5,30x10 ⁻⁰⁵
A7	1,95x10 ⁻⁰⁸	1,19x10 ⁵	2,32x10 ⁻⁰³	2,05x10 ⁻⁰⁸	1,53x10 ⁵	3,15x10 ⁻⁰³
B7	2,14x10 ⁻⁰⁸	1,98x10 ⁵	4,23x10 ⁻⁰³	3,09x10 ⁻⁰⁸	2,08x10 ⁵	6,42x10 ⁻⁰³
C7	2,30x10 ⁻⁰⁸	1,52x10 ⁵	3,49x10 ⁻⁰³	2,75x10 ⁻⁰⁸	1,94x10 ⁵	5,35x10 ⁻⁰³
D7	1,90x10 ⁻⁰⁸	1,13x10 ⁵	2,14x10 ⁻⁰³	2,00x10 ⁻⁰⁸	1,43x10 ⁵	2,84x10 ⁻⁰³
A8	2,22x10 ⁻⁰⁸	1,02x10 ⁵	2,26x10 ⁻⁰³	2,19x10 ⁻⁰⁸	1,47x10 ⁵	3,21x10 ⁻⁰³
B8	2,76x10 ⁻⁰⁸	1,48x10 ⁵	4,07x10 ⁻⁰³	2,63x10 ⁻⁰⁸	1,99x10 ⁵	5,25x10 ⁻⁰³
C8	2,94x10 ⁻⁰⁸	1,08x10 ⁵	3,17x10 ⁻⁰³	3,56x10 ⁻⁰⁸	1,66x10 ⁵	5,89x10 ⁻⁰³
D8	3,50x10 ⁻⁰⁸	8,20x10 ⁴	2,87x10 ⁻⁰³	2,16x10 ⁻⁰⁸	1,23x10 ⁵	2,66x10 ⁻⁰³
A15	2,96x10 ⁻¹⁰	3,23x10 ⁵	9,58x10 ⁻⁰⁵	3,64x10 ⁻¹⁰	4,53x10 ⁵	1,65x10 ⁻⁰⁴
B15	5,21x10 ⁻¹⁰	3,71x10 ⁵	1,93x10 ⁻⁰⁴	6,27x10 ⁻¹⁰	5,23x10 ⁵	3,28x10 ⁻⁰⁴
C15	4,30x10 ⁻¹⁰	3,76x10 ⁵	1,62x10 ⁻⁰⁴	6,53x10 ⁻¹⁰	5,25x10 ⁵	3,43x10 ⁻⁰⁴
D15	2,94x10 ⁻¹⁰	3,27x10 ⁵	9,60x10 ⁻⁰⁵	5,33x10 ⁻¹⁰	4,37x10 ⁵	2,33x10 ⁻⁰⁴
E15	1,74x10 ⁻⁰⁹	2,25x10 ⁵	3,92x10 ⁻⁰⁴	1,86x10 ⁻⁰⁹	2,90x10 ⁵	5,40x10 ⁻⁰⁴
F15	1,04x10 ⁻⁰⁹	1,97x10 ⁵	2,06x10 ⁻⁰⁴	1,33x10 ⁻⁰⁹	2,24x10 ⁵	2,97x10 ⁻⁰⁴
G15	1,59x10 ⁻⁰⁹	2,09x10 ⁵	3,32x10 ⁻⁰⁴	1,72x10 ⁻⁰⁹	2,69x10 ⁵	4,61x10 ⁻⁰⁴
H15	9,53x10 ⁻¹⁰	1,99x10 ⁵	1,89x10 ⁻⁰⁴	1,17x10 ⁻⁰⁹	2,30x10 ⁵	2,69x10 ⁻⁰⁴
A16	2,93x10 ⁻¹⁰	2,75x10 ⁵	8,07x10 ⁻⁰⁵	6,57x10 ⁻¹⁰	3,70x10 ⁵	2,43x10 ⁻⁰⁴
B16	4,45x10 ⁻¹⁰	3,22x10 ⁵	1,44x10 ⁻⁰⁴	6,60x10 ⁻¹⁰	4,66x10 ⁵	3,08x10 ⁻⁰⁴
C16	4,19x10 ⁻¹⁰	2,68x10 ⁵	1,12x10 ⁻⁰⁴	8,88x10 ⁻¹⁰	3,84x10 ⁵	3,41x10 ⁻⁰⁴
D16	4,46x10 ⁻¹⁰	2,40x10 ⁵	1,07x10 ⁻⁰⁴	6,11x10 ⁻¹⁰	3,56x10 ⁵	2,17x10 ⁻⁰⁴
E16	1,76x10 ⁻⁰⁹	1,62x10 ⁵	2,84x10 ⁻⁰⁴	2,19x10 ⁻⁰⁹	2,20x10 ⁵	4,82x10 ⁻⁰⁴
F16	8,52x10 ⁻¹⁰	1,41x10 ⁵	1,20x10 ⁻⁰⁴	1,37x10 ⁻⁰⁹	1,85x10 ⁵	2,53x10 ⁻⁰⁴
G16	1,32x10 ⁻⁰⁹	1,53x10 ⁵	2,01x10 ⁻⁰⁴	1,75x10 ⁻⁰⁹	1,95x10 ⁵	3,40x10 ⁻⁰⁴
H16	8,81x10 ⁻¹⁰	1,36x10 ⁵	1,20x10 ⁻⁰⁴	1,13x10 ⁻⁰⁹	1,82x10 ⁵	2,06x10 ⁻⁰⁴

Các kết quả thử nghiệm trên Bảng 5 cho thấy rằng toàn bộ các dòng đều có ái lực mạnh với cả CD3 của người và CD3ε/δ của khỉ đuôi dài; và trong số các dòng này, dòng A15, B15, C15, D15, A16, B16, C16, và D16 có ái lực mạnh nhất.

Ví dụ 4. Đo ái lực với các tế bào T của người của các kháng thể nhân tạo kháng CD3

Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để đo ái lực với các tế bào T của người của các kháng thể nhân tạo kháng CD3 (SP34) được chọn lọc theo ví dụ 2. Cụ thể, các tế bào H9 (ATCC® HTB-176TM) được điều chế ở mật độ bằng 2×10^5 tế bào trong dung dịch đệm FACS (100 μ L) (dung dịch bao phủ FBS/FACS 1%) cho mỗi mẫu kháng thể, sau đó kháng thể (1 μ g) được sử dụng để xử lý các tế bào. Hỗn hợp thu được được bảo quản trong 25 phút trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (3mL) được thực hiện, và phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ. Tiếp theo, dung dịch đệm FACS (100 μ L) chứa kháng thể IgG của người được tiếp hợp với phycoerythrin (1 μ g) được sử dụng để xử lý các tế bào, và hỗn hợp thu được được bảo quản trong 25 phút trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (3mL) được thực hiện, và phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được xử lý bằng dung dịch formaldehyt 4%, bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút, sau đó xử lý với dung dịch đệm FACS (3mL). Phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút, sau đó dịch nổi được loại bỏ. Quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (350 μ L) được thực hiện, và thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để phân tích ái lực của các kháng thể với tế bào T của người. Kết quả phân tích được thể hiện trên Fig.1. Như được thể hiện trên Fig.1, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng toàn bộ các kháng thể, đã gắn kết với CD3 ϵ / δ tái tổ hợp của người, cũng gắn kết đặc hiệu với tế bào T của người.

Ví dụ 5. Đo ái lực với các tế bào T của khỉ của các kháng thể nhân tạo kháng CD3

Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để đo ái lực với các tế bào T của khỉ của các kháng thể nhân tạo kháng CD3 (SP34) được chọn lọc theo ví dụ 2. Cụ thể, các tế bào lá lách của khỉ được điều chế ở mật độ bằng 10^6 tế bào trong dung dịch đệm FACS (100 μ L) cho mỗi mẫu kháng thể, sau đó kháng thể (1 μ g) được sử dụng để xử lý các tế bào. Hỗn hợp thu được được bảo quản trong 25 phút trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (3mL) được thực hiện, và phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó,

dịch nổi được loại bỏ. Tiếp theo, dung dịch đệm FACS (100 μ L) chứa kháng thể IgG của người được tiếp hợp với phycoerythrin (1 μ g) được sử dụng để xử lý các tế bào, và hỗn hợp thu được được bảo quản trong 25 phút trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (3mL) được thực hiện, và phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được xử lý bằng kháng thể kháng CD20 được tiếp hợp với FITC, kháng thể kháng CD14 được tiếp hợp với PE-Cy5, kháng thể 7-AAD, kháng thể kháng CD16 được tiếp hợp với APC-Cy7, hoặc kháng thể kháng CD45 được tiếp hợp với V450, và hỗn hợp thu được được bảo quản trong 25 phút trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (3mL) được thực hiện, và phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được xử lý bằng dung dịch formaldehyt 4%, bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút, sau đó xử lý với dung dịch đệm FACS (3mL). Phương pháp ly tâm được thực hiện ở tốc độ bằng 2000 vòng/phút trong 3 phút, sau đó dịch nổi được loại bỏ. Quá trình xử lý bằng dung dịch đệm FACS (350 μ L) được thực hiện, và thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để phân tích ái lực của các kháng thể với tế bào T của người. Kết quả phân tích được thể hiện trên Fig.2. Như được thể hiện trên Fig.2, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng toàn bộ các kháng thể, đã gắn kết với CD3 ϵ / δ tái tổ hợp của khí đuôi dài, cũng gắn kết đặc hiệu với tế bào T của khí.

Mặc dù các phương án của sáng chế đã được mô tả thông các ví dụ và hình vẽ nêu trên, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được tạo ra mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Ví dụ, có thể đạt được các kết quả mong muốn ngay cả khi các phương pháp như đã được mô tả được thực hiện theo trình tự khác với phương pháp đã được mô tả, và/hoặc các thành phần như đã được mô tả được kết hợp ở dạng khác với phương pháp đã được mô tả, hoặc được thay thế bằng các thành phần khác hoặc các thành phần tương đương. Do đó, các phương pháp thực hiện khác, các phương án khác, và các biến thể tương đương của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo cũng nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

(a-1) miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 hoặc SEQ ID NO.8; và

(a-2) miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20, hoặc SEQ ID NO.21, hoặc (b-1) miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15 hoặc SEQ ID NO.16; và

(b-2) miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.24, hoặc SEQ ID NO.25,

trong đó miền VL của (a-1) và (b-1) chứa vùng xác định bổ sung CDR1 (complementarity determining region-CDR) chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng CDR2 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.30, và vùng CDR3 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.31; và

trong đó miền VH của (a-2) và (b-2) chứa vùng xác định bổ sung CDR1 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32, vùng CDR2 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.33, và vùng CDR3 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34.

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với cụm biệt hóa 3 (CD3-cluster of differentiation 3).

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó CD3 bao gồm CD3 có nguồn gốc từ người và CD3 có nguồn gốc từ khỉ.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với tế bào T.

5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó tế bào T bao gồm tế bào T có nguồn gốc từ người và tế bào T có nguồn gốc từ khỉ.

6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân tạo.
7. Polynucleotit mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
8. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 7.
9. Tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo điểm 8.
10. Phương pháp sản xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 9.
11. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
12. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2.
13. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3.
14. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4.
15. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 5.
16. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 6.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CREEN CROSS CORPORATION; MOGAM INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG CỤM BIỆT HÓA 3 VÀ DUỐC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> PCB810112GCC
 <160> 34
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dòng VL-1 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 1
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 2
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dòng VL-2 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 2
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 3
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dòng VL-3 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 3
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 4
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dòng VL-4 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 4
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

```

      1           5           10           15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20           25           30
Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
      35           40           45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
      50           55           60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
      65           70           75           80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85           90           95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100          105          110
<210>      5
<211>     110
<212>     PRT
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     Dòng VL-5 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400>      5
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
      1           5           10           15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20           25           30
Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
      35           40           45
Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
      50           55           60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
      65           70           75           80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85           90           95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100          105          110
<210>      6
<211>     110
<212>     PRT
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     Dòng VL-6 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400>      6
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
      1           5           10           15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20           25           30
Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
      35           40           45
Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
      50           55           60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
      65           70           75           80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85           90           95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100          105          110
<210>      7
<211>     110
<212>     PRT
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     Dòng VL-7 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400>      7
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
      1           5           10           15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20           25           30
Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
      35           40           45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
      50           55           60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
      65           70           75           80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85           90           95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100          105          110
<210>      8
<211>     110

```

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VL-8 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 8
Gln Ala Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1           5           10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20          25          30
Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35          40          45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50          55          60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65          70          75          80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85          90          95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100         105         110

<210> 9
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VL-9 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 9
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1           5           10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20          25          30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35          40          45
Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50          55          60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65          70          75          80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85          90          95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100         105         110

<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VL-10 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 10
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1           5           10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20          25          30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35          40          45
Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50          55          60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65          70          75          80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85          90          95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100         105         110

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VL-11 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 11
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1           5           10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20          25          30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35          40          45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50          55          60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65          70          75          80

```

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đồng VL-12 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 12
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 13
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đồng VL-13 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 13
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 14
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đồng VL-14 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 14
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 15
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đồng VL-15 của kháng thể SP34 nhân tạo
 <400> 15
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30


```

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
  35          40          45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
  50          55          60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
  65          70          75          80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85          90          95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
    100          105          110
<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VL-16 của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 16
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
  1          5          10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20          25          30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
    35          40          45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
  50          55          60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
  65          70          75          80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85          90          95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
    100          105          110
<210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Miền VL của kháng thể SP34 của chuột nhắt
<400> 17
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
  1          5          10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20          25          30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
    35          40          45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
  50          55          60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
  65          70          75          80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85          90          95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
    100          105          110
<210> 18
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-A của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 18
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 Asn Thr Tyr
      20          25          30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35          40          45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
  50          55          60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
  65          70          75          80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85          90          95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
    100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115          120          125

```

```

<210> 19
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-B của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 19
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 Asn Thr Tyr
      20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35           40           45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50           55           60
Ser Val Lys Asp 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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125

<210> 20
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-C của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 20
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 Asn Thr Tyr
      20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35           40           45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50           55           60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Thr
      65           70           75           80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125

<210> 21
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-D của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 21
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 Asn Thr Tyr
      20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35           40           45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50           55           60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser 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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125

<210> 22
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-E của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 22
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 Asn Thr Tyr
      20      25      30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50      55      60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
      65      70      75      80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85      90      95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100     105     110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115     120     125
<210> 23
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-F của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 23
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 Asn Thr Tyr
      20      25      30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50      55      60
Ser Val Lys Asp 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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100     105     110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115     120     125
<210> 24
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-G của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 24
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 Asn Thr Tyr
      20      25      30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50      55      60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Thr
      65      70      75      80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85      90      95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100     105     110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115     120     125
<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dòng VH-H của kháng thể SP34 nhân tạo
<400> 25
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 Asn Thr Tyr
      20      25      30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50      55      60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser 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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125
<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Miền VH của kháng thể SP34 của chuột nhắt
<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
      20          25          30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35          40          45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
      50          55          60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
      65          70          75          80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
      85          90          95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
      100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125
<210> 27
<211> 104
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Miền CL lamda
<400> 27
Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1          5          10          15
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
      20          25          30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
      35          40          45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
      50          55          60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
      65          70          75          80
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
      85          90          95
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
      100
<210> 28
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Miền CH IgG1
<400> 28
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100          105          110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165          170          175

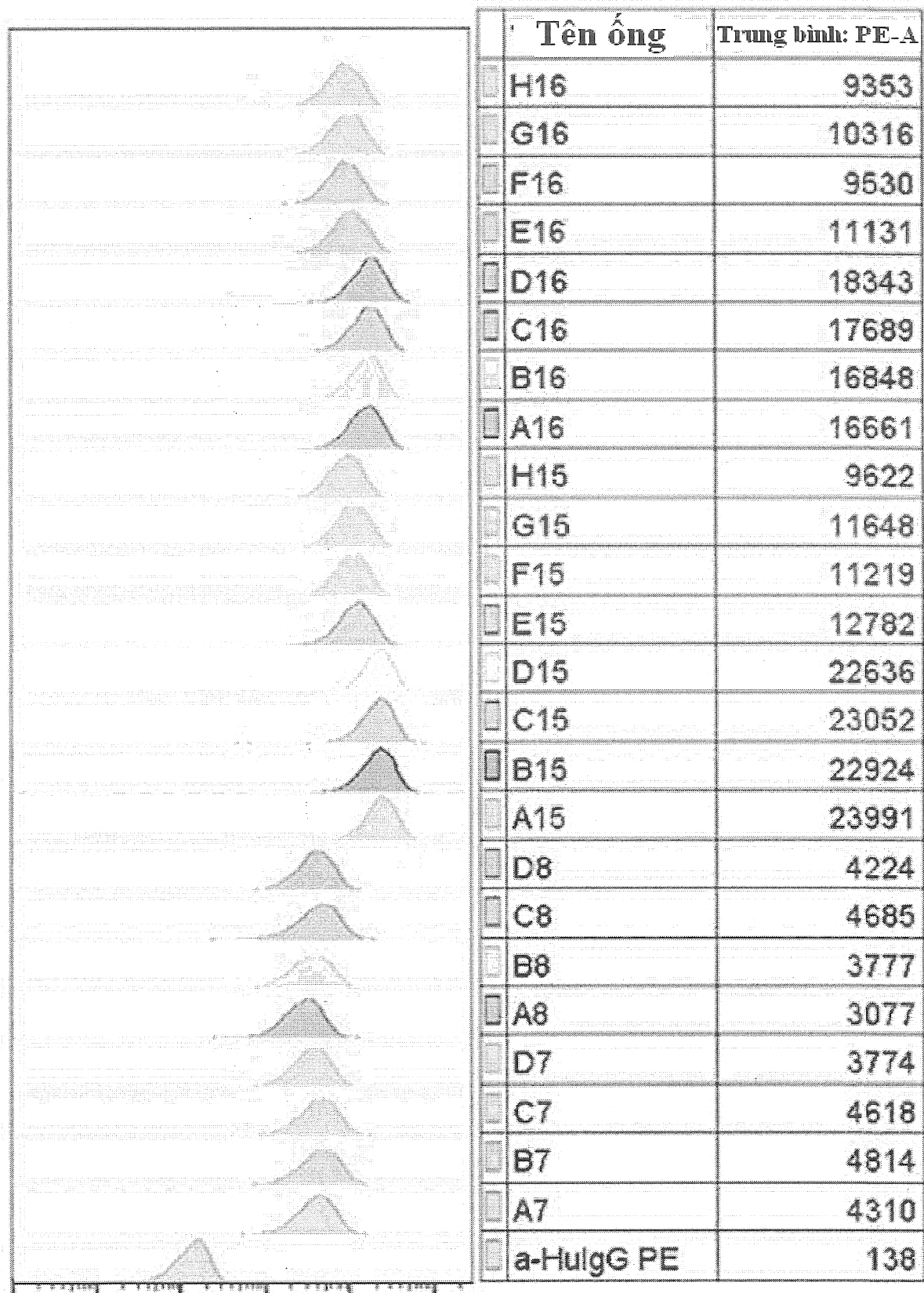
```

```

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325          330

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng CDR1 (VL) của kháng thể kháng CD3
<400> 29
Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
  1          5          10
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng CDR2 (VL) của kháng thể kháng CD3
<400> 30
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
  1          5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng CDR3 (VL) của kháng thể kháng CD3
<400> 31
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
  1          5
<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng CDR1 (VH) của kháng thể kháng CD3
<400> 32
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
  1          5          10
<210> 33
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng CDR2 (VH) của kháng thể kháng CD3
<400> 33
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
  1          5          10          15
Val Lys Asp
<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng CDR3 (VH) của kháng thể kháng CD3
<400> 34
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
  1          5          10          15

```



CD3

Fig.1

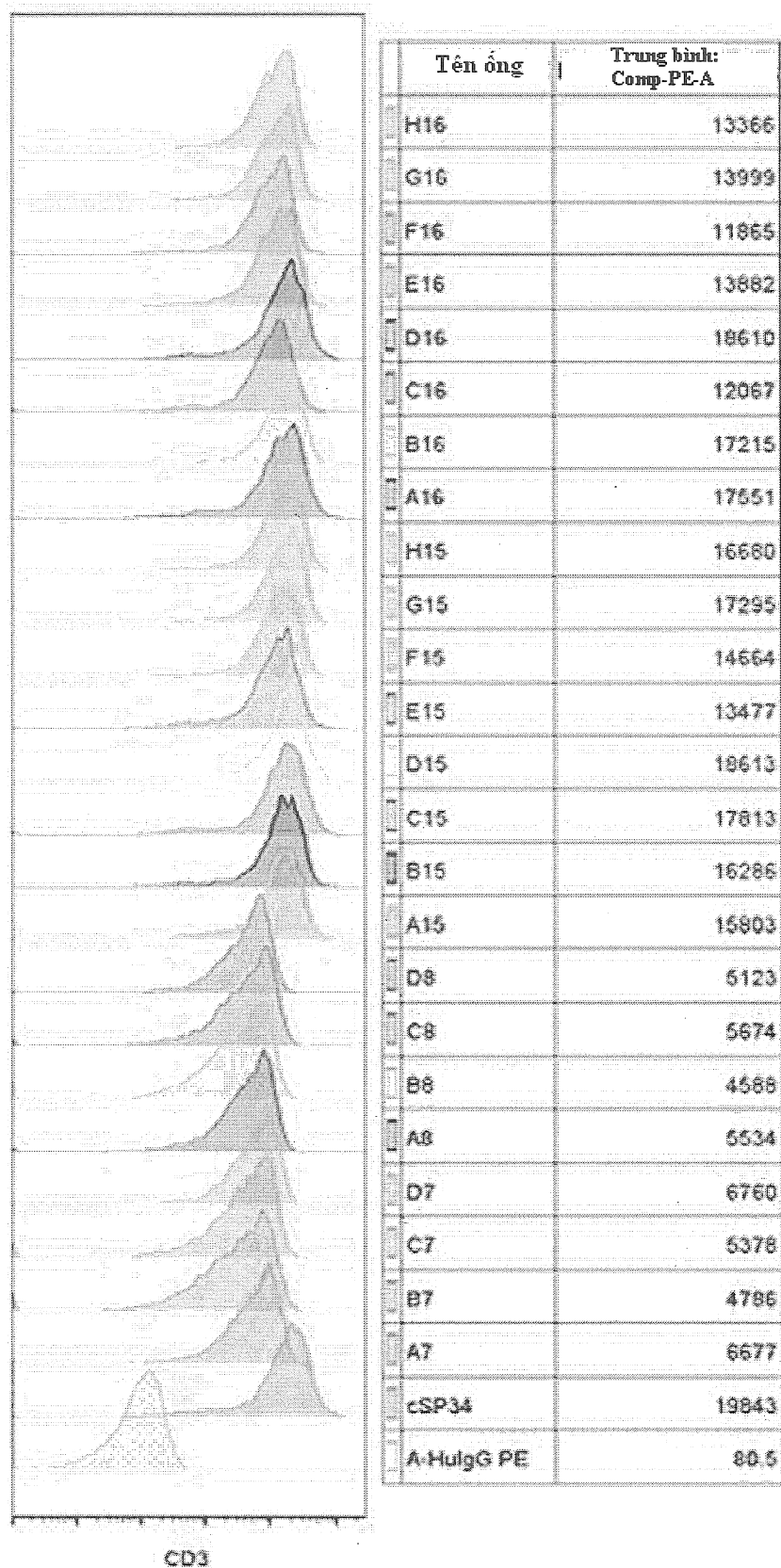


Fig.2