



(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



1-0042602

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

-
- (21) 1-2019-06866 (22) 30/05/2018
(86) PCT/KR2018/006182 30/05/2018 (87) WO2018/221969 06/12/2018
(30) 10-2017-0067106 30/05/2017 KR; 10-2018-0061888 30/05/2018 KR
(45) 27/01/2025 442 (43) 25/06/2020 387
(73) Chong Kun Dang Pharmaceutical Corp. (KR)
8, Chungjeong-ro Seodaemun-gu Seoul 03742, Republic of Korea
(72) MOON, Seung Kee (KR); LEE, Kyung Woo (KR); JEON, Eun Ju (KR); AN, Ki
Young (KR); CHOI, Eun Su (KR).
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)
-

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG C-MET, PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN
C-MET VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2019-06866

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị ung thư, trong đó kháng thể thể hiện hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư và hoạt tính kháng ung thư tốt ngay cả với một lượng nhỏ, do đó phòng và điều trị ung thư một cách có hiệu quả.

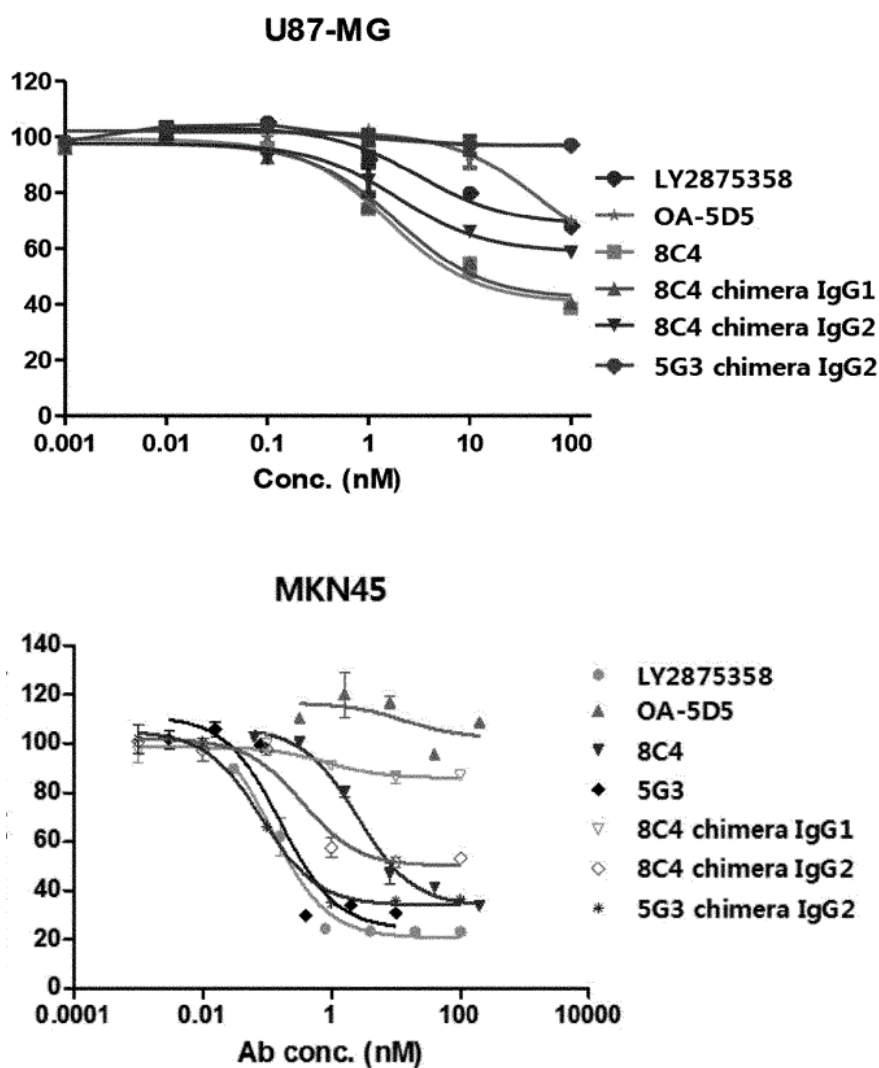


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, cụ thể hơn là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan người (c-Met), phương pháp phát hiện kháng nguyên c-Met và chế phẩm bao gồm kháng thể này hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó dùng để phòng hoặc điều trị ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tyroxin kinaza thụ thể (RTK) đóng vai trò là tác nhân điều biến thiết yếu đối với quá trình tăng trưởng, biệt hóa, tạo mạch mới, phục hồi mô tế bào, v.v.. Bên cạnh các quá trình sinh lý thông thường, sự biểu hiện bất thường của RTK nhất định có liên quan đến sự phát triển và tiến triển của nhiều loại ung thư. Do đó, RTK được coi là mục tiêu thuốc có triển vọng để điều trị ung thư.

Thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGFR; c-Met), vốn là một loại RTK, là thụ thể trên bề mặt tế bào liên quan đến yếu tố tăng trưởng tế bào gan được coi là yếu tố phân tán (HGF/SF) (Laird AD và cộng sự, Expert. Opin. Investig. Drugs 12: 51-64 (2003)). Sự hoạt hóa c-Met bất thường bởi HGF, vốn là một trong những cơ chế gây ung thư điển hình, được biết là có liên quan đến sự tăng sinh khối u, ức chế sự chết theo chương trình của tế bào, sự tạo mạch mới, sự xâm lấn, di căn và các quá trình tương tự khác (Bottaro DP và cộng sự, Science 251: 802-804 (1991), Day RM và cộng sự, Oncogene 18: 3399-3406 (1999)). Ngoài ra, có báo cáo rằng sự hoạt hóa c-Met bất thường do sự đột biến và khuếch đại c-Met có liên quan đến các bệnh ung thư khác nhau như ung thư phổi, ung thư ruột kết, ung thư đầu và cổ, ung thư dạ dày, ung thư vú, v.v., và cũng liên quan đến sự gia tăng tính xâm lấn của khối u và tiên lượng bất lợi của nó (Lefebvre J và cộng sự, FASEB J 26: 1387-1399 (2012), Liu X và cộng sự, Trends Mol Med 16: 37-45 (2010), Smolen GA và cộng sự, Proc Natl Acad Sci USA 103: 2316-2321 (2006), Foveau B và cộng sự, Mol Biol Cell 20: 2495-2507 (2009)).

Do đó, c-Met đã được tập trung chú ý như là kháng nguyên đích để điều trị các loại ung thư khác nhau, và các phương pháp tiếp cận khác nhau đã được thực hiện để ức

chế sự biểu hiện và hoạt tính của c-Met. Các chất ức chế tyrosin kinaza phân tử nhỏ đặc hiệu c-Met được biết đến nay có Tivantinib (ArQule), INC280 (Novatis), AMG337 (Amgen), v.v... Và Rilotumumab (Amgen), Ficlatuzumab (AVEP Pharmaceuticals), HuL2G7 (Galaxy Biotech), v.v..., đã được phát triển làm kháng thể đơn dòng đặc hiệu HGF, vốn là phối tử của c-Met. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng đối kháng hướng c-Met có Onartuzumab (WO 2006/015371) trong giai đoạn lâm sàng III của quá trình phát triển bởi Genentech, Emibetuzumab (WO 2010/059654) trong giai đoạn lâm sàng II của quá trình phát triển bởi Lilly, SAIT-301 (US 2014154251) trong giai đoạn lâm sàng I của quá trình phát triển, ABT-700 (Wang J và cộng sự, BMC Cancer. 16: 105-118(2016)), v.v.. Onartuzumab là kháng thể đối kháng đơn giá có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng hai giá (5D5), đóng vai trò là tác nhân tác động lên c-Met (Mark Merchant, và cộng sự, Proc Natl Acad Sci U S A. 110(32): E2987-E299 (2013)). Do đó, nhiều loại thuốc khác nhau đã được phát triển liên quan đến c-Met, và c-Met liên có liên quan đến sự xuất hiện và tiến triển của các loại ung thư khác nhau như được mô tả trên đây, do đó nhu cầu phát triển liên tục tác nhân trị liệu có khả năng điều trị ung thư bằng cách hướng đích c-Met được thúc đẩy liên tục.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể kháng c-Met gắn c-Met với ái lực cao và cũng đã xác định được rằng kháng thể kháng c-Met, dạng khảm của chúng và các kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể tối ưu hóa ái lực ức chế đáng kể sự tăng sinh của các tế bào khối u và có tác dụng chống ung thư tốt, do đó đã hoàn thành sáng chế.

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met).

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic, tế bào chủ có vector biểu hiện được đưa vào, phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó sử dụng tế bào chủ.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm phát hiện c-Met bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bộ dụng cụ (kit) phát hiện bao gồm chế phẩm này, và phương pháp phát hiện kháng nguyên c-Met sử dụng chế phẩm này.

Mục tiêu khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm phòng hoặc điều trị ung thư bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), có một trình tự khác biệt, và thể hiện hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư tốt cũng như hoạt tính chống ung thư tốt ngay cả với một lượng nhỏ kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, do đó có hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh như ung thư.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong đó, mỗi phần mô tả và phương án thực hiện được bộc lộ theo sáng chế có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án thực hiện tương ứng khác. Nói cách khác, mọi sự kết hợp của các thành phần khác nhau được bộc lộ theo sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả chi tiết sau đây.

Để đạt được các mục tiêu trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met).

Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế, gắn đặc hiệu với c-Met, gắn với c-Met với ái lực cao để ức chế sự biểu hiện hoạt tính của nó, do đó thể hiện hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tốt, do đó kháng thể độc lập hoặc cùng với các chất mang được dùng thông thường, thuốc chống ung thư khác, chất hỗ trợ chống ung thư, v.v. có thể được sử dụng một cách có giá trị làm chế phẩm chống ung thư để phòng hoặc điều trị ung thư.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể” có nghĩa là phân tử protein đóng vai trò là thụ thể để nhận diện đặc hiệu kháng nguyên, bao gồm phân tử globulin miễn dịch có khả năng phản ứng miễn dịch với một số kháng nguyên, trong đó, ví dụ về kháng thể có thể bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể chiều dài đầy đủ và mảnh kháng thể. Ngoài ra, thuật ngữ có thể bao gồm phân tử hai giá hoặc đặc hiệu kép (cụ thể là kháng thể đặc hiệu kép), diabody, triabody, hoặc tetrabody.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” dùng để chỉ phân tử kháng thể có thành phần phân tử duy nhất thu được từ cùng một quần thể kháng thể, trong đó kháng thể đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu và ái lực gắn duy nhất đối với một quyết định kháng

nguyên (epitop) nhất định. Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể chiều dài đầy đủ” có cấu trúc với hai chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nặng chiều dài đầy đủ, trong đó mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với một chuỗi nặng nhờ liên kết disulfua. Vùng hằng định của chuỗi nặng có các loại γ (gamma), μ (mu), α (alpha), δ (delta) và ϵ (epsilon), và có cá phân lớp γ_1 (gamma1), γ_2 (gamma2), γ_3 (gamma3), γ_4 (gamma4), α_1 (alpha1) và α_2 (alpha2). Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có các loại κ (kappa) và λ (lambda). IgG bao gồm các phân loại IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4.

Theo sáng chế, thuật ngữ “mảnh”, “mảnh kháng thể” và “mảnh gắn kháng nguyên” dùng để chỉ mảnh bất kỳ của kháng thể theo sáng chế có chức năng gắn kháng nguyên của kháng thể, trong đó thuật ngữ được sử dụng thay thế cho nhau. Các mảnh gắn kháng nguyên mẫu bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fv và tương tự, nhưng không giới hạn.

Fab có cấu trúc với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng hằng định của chuỗi nhẹ và vùng hằng định thứ nhất của chuỗi nặng (miền CH1), và cũng có một vị trí gắn kháng nguyên. Mảnh gắn kháng nguyên của phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có nghĩa là mảnh có chức năng gắn kháng nguyên, và Fab' khác với Fab ở chỗ Fab' có vùng bản lề gồm một hay nhiều xystein dư ở đầu C của miền CH1 chuỗi nặng. Kháng thể F(ab')₂ được tạo thành theo cách mà xystein dư cả vùng bản lề của dạng Fab' tạo thành liên kết disulfua. Fv là mảnh kháng thể tối thiểu chỉ có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó công nghệ tái tổ hợp dùng để tạo ra mảnh Fv được mô tả trong các đơn sáng chế có số công bố quốc tế WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086, WO 88/09344 và tương tự. Fv hai chuỗi được tạo thành theo cách, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với nhau bởi liên kết không cộng hóa trị, trong khi Fv chuỗi đơn được tạo thành theo cách, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ thường được liên kết với nhau hoặc bằng liên kết cộng hóa trị thông qua đoạn liên kết peptit hoặc được liên kết trực tiếp ở đầu C, do đó tạo thành cấu trúc tương tự dime như được minh họa trên Fv hai chuỗi. Mảnh kháng thể có thể thu được bằng cách sử dụng protein hydrolaza (cụ thể là, Fab có thể thu được bằng cách thực hiện thủy phân giới hạn toàn bộ kháng thể bằng papain và mảnh F(ab')₂ có thể thu được bằng cách thực hiện thủy phân giới hạn toàn bộ kháng thể bằng pepsin) hoặc có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen, nhưng không giới hạn.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất kháng thể gắn đặc hiệu với c-Met là:

(a) kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm vùng xác định bổ trợ (CDR) 1 của chuỗi nhẹ được biểu diễn bởi trình tự định danh số (SEQ ID NO:) 1; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 2; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 8; và CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9;

(b) kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 4; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 5; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 10; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 11; và CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 12; hoặc

(c) các kháng thể được tối ưu hóa ái lực của chúng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chuỗi nặng” có thể bao gồm chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và mảnh của chúng bao gồm miền biến đổi VH với trình tự axit amin có trình tự vùng biến đổi đủ để tạo ra tính đặc hiệu với kháng nguyên, cũng như ba miền CH1, CH2 và CH3 của vùng hằng định. Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ “chuỗi nhẹ” có thể bao gồm cả chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ và mảnh của chúng bao gồm miền biến đổi VL với trình tự axit amin có vùng biến đổi đủ để tạo ra tính đặc hiệu với kháng nguyên, cũng như miền hằng định CL.

Theo sáng chế, kháng thể có thể bao gồm cả kháng thể chuột được tạo ra từ chuột, và dạng đột biến của chúng, trong đó phần trình tự axit amin của kháng thể ban đầu được thay thế, được thêm và/hoặc được bớt axit amin để cải thiện ái lực, khả năng miễn dịch, v.v. của kháng thể. Dạng đột biến có thể bao gồm kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể được tối ưu hóa ái lực, v.v., nhưng không giới hạn. Theo sáng chế, dạng đột biến đề cập toàn diện đến kháng thể, trong đó phần trình tự axit amin CDR của kháng thể ban đầu bị đột biến (được thay thế, thêm hoặc bớt axit amin) với điều kiện có cùng CDR như kháng thể ban đầu hoặc hướng đích cùng epitop như kháng thể ban đầu. Dạng đột biến có thể được điều chỉnh phù hợp bởi người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật để cải thiện ái lực, khả năng miễn dịch và tính

năng tương tự khác của kháng thể trong phạm vi bảo toàn khả năng gắn đối với cùng epitop.

Nói cách khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm trình tự kháng thể kháng c-Met được mô tả sau đây cũng như phần tương đương sinh học của chúng, trong phạm vi nhận diện đặc hiệu c-Met. Cụ thể là, sự thay đổi thêm axit amin có thể được thực hiện trong trình tự axit amin của kháng thể, để cải thiện hơn nữa ái lực liên kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Sự thay đổi bao gồm bớt, chèn và/hoặc thay thế đoạn dư trong trình tự axit amin của kháng thể. Sự đột biến axit amin được thực hiện dựa vào sự giống nhau tương đối của nhóm thế chuỗi phụ axit amin, cụ thể là, tính kỵ nước, tính ưa nước, tích điện, kích thước, v.v.. Bằng cách phân tích kích thước, hình dạng và loại nhóm thế chuỗi phụ axit amin, có thể thấy rằng arginin, lysin, và histidin tích điện dương; alanin, glyxin, và serin có kích thước tương tự; và phenylalanin, tryptophan và tyrosin có hình dạng tương tự. Do đó, dựa vào các tiêu chí trên, có thể thấy rằng arginin, lysin và histidin; alanin, glyxin và serin; phenylalanin, tryptophan và tyrosin là các phân tử tương đương chức năng sinh học.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể khảm” là kháng thể được tạo thành theo cách vùng biến đổi của kháng thể chuột được tái tổ hợp với vùng hằng định của kháng thể người, dẫn đến sự cải thiện đáng kể về phản ứng miễn dịch so với kháng thể chuột.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể được làm tương thích với người” có nghĩa là kháng thể được tạo thành theo cách trình tự protein của kháng thể có nguồn gốc từ các loại không phải con người được cải biến thành dạng tương tự như dạng đột biến kháng thể được tạo ra một cách tự nhiên từ con người. Cụ thể là, kháng thể được làm tương thích với người có thể được sản xuất bằng cách tạo ra vùng biến đổi được làm tương thích với người thông qua tái tổ hợp CDR có nguồn gốc từ chuột với FR có nguồn gốc từ kháng thể người rồi tiếp đó tái tổ hợp vùng biến đổi được làm tương thích với người với vùng hằng định của kháng thể người. Tuy nhiên, việc ghép CDR đơn giản chỉ tạo ra kháng thể được làm tương thích với người ái lực thấp, vì vậy một số phần dư axit amin FR chính, vốn được xem là có ảnh hưởng đến cấu trúc ba chiều của CDR, có thể phát triển ái lực với kháng thể chuột, do đó đạt đến mức tương đương ái lực của kháng thể chuột ban đầu.

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể được tối ưu hóa ái lực”, là dạng đột biến được tạo ra theo cách phần trình tự CDR của kháng thể nhất định được thay thế, thêm hoặc bớt, có nghĩa là kháng thể có ái lực gắn tốt hơn với kháng nguyên trong khi gắn với cùng epitop kháng nguyên như kháng thể nhất định. Cụ thể là, kháng thể được tối ưu hóa ái lực của sáng chế dùng để chỉ kháng thể đột biến gắn với cùng epitop như: (a) kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 2; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng có CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 8; CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9; hoặc (b) kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 4; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 5; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nặng có CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 10; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 11; CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 12. Người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể tạo ra kháng thể được tối ưu hóa ái lực bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết dựa vào các trình tự CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nhất định. Cụ thể là, kháng thể được tối ưu hóa ái lực của sáng chế có thể được tạo ra thông qua biểu hiện trên thể thực khuẩn. Theo sáng chế, thuật ngữ “biểu hiện trên thể thực khuẩn” dùng để chỉ kỹ thuật biểu hiện polypeptit đột biến dưới dạng protein dung hợp với ít nhất một phần protein phủ trên thể thực khuẩn, cụ thể là trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn dạng sợi. Sự hữu ích của phương pháp biểu hiện trên thể thực khuẩn nằm ở chỗ nó nhắm vào một thư viện lớn các đột biến protein ngẫu nhiên, do đó phân loại kịp thời và hiệu quả các chuỗi gắn kháng nguyên đích với ái lực cao. Thư viện biểu hiện các peptit và protein trên thể thực khuẩn đã được sử dụng để sàng lọc hàng triệu polypeptit để xem polypeptit có đặc tính liên kết đặc hiệu.

Theo phương án thực hiện mẫu, sáng chế có thể đề xuất kháng thể bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 13 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 15; hoặc (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 16. Ví dụ, sáng chế có thể đề xuất kháng thể bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 19; hoặc (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ

ID NO: 18 và vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 20, nhưng không giới hạn.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, nhóm tế bào lai thu được từ chuột, trong đó protein dung hợp miền Sema c-Met người/Fc là kháng nguyên, từ đó kháng thể kháng c-Met gắn đặc hiệu với c-Met được chọn bằng cách sàng lọc với phương pháp phân tích xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) sử dụng protein dung hợp c-Met/His làm kháng nguyên. Kháng thể được chọn và kháng thể khảm của chúng có hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tương đương hoặc thậm chí tốt hơn LY2875358 và OA-5D5 có sẵn trên thị trường (Bảng 3 và Fig.1), do đó được sử dụng rất có giá trị trong phòng hoặc điều trị ung thư.

Theo phương án thực hiện mẫu khác, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23; (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 22 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 24; (c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 31; hoặc (d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 32. Cụ thể là, sáng chế có thể đề xuất kháng thể bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 25 và vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 27; (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 26 và vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 28; (c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 33 và vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 35; hoặc (d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 34 và vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 36, nhưng không giới hạn. Ngoài ra, sáng chế có thể đề xuất kháng thể bao gồm vùng bản lề được biểu diễn bởi một trong các trình tự định danh từ SEQ ID NO: 37 đến SEQ ID NO: 44.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người bao gồm CDR của kháng thể thu được thông qua cách lựa chọn biểu hiện trên thể thực khuẩn được tạo ra, và qua kết quả nghiên cứu đã xác định được rằng kháng thể thể hiện hoạt tính chống ung thư tương tự như kháng thể khảm của sáng chế (ví dụ 2 và

3). Ngoài ra, theo phương án thực hiện cụ thể khác của sáng chế, hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể được đánh giá theo trình tự vùng bản lề, và đã xác định được rằng sự tăng sinh của hầu hết các tế bào khối u đã được ức chế một cách hiệu quả, thậm chí có một chút khác biệt trong hoạt tính tùy thuộc vào sự khác biệt của chuỗi bản lề (Bảng 7).

Theo phương án thực hiện mẫu khác nữa, nhưng không giới hạn, sáng chế đề xuất kháng thể được tối ưu hóa ái lực cho kháng thể được làm tương thích với người, trong đó một hay nhiều trình tự axit amin được thay thế từ kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 2; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 8; CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9, và trong đó, (i) G ở vị trí thứ nhất của CDR1 của chuỗi nhẹ được thay thế bởi A, E, K, L, N, R, S, V hoặc W; A ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi C, G, I, P, S, T hoặc V; S ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi G, M, N, P, Q, R, S hoặc T; E ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi A, D, F, G, H, K, M, Q, R, S, T hoặc V; N ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi A, D, E, G, K, L, P, Q, R, S, T hoặc V; I ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi A, F, L, M, Q, R, S, T hoặc V; Y ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi F, H, R hoặc V; hoặc G ở vị trí thứ tám của nó được thay thế bởi D, F, H, M, N, R, S, T hoặc V; (ii) G ở vị trí thứ nhất của CDR2 của chuỗi nhẹ được thay thế bởi D, F, H, K, P, Q, S, V hoặc Y; T ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi Q; hoặc N ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi G; (iii) Q ở vị trí thứ nhất của CDR3 của chuỗi nhẹ được thay thế bởi E, G, I, M hoặc N; N ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi A, D, E, H, L, Q, S hoặc T; V ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi I, L, M, N, Q, S hoặc T; L ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi F, H, I, M, R, S, V, W hoặc Y; S ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi C, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, T, V hoặc Y; S ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, T, V hoặc Y; P ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi A, D, E, G, N, Q, S hoặc V; Y ở vị trí thứ tám của nó được thay thế bởi E, F, L, M hoặc Q; hoặc T ở vị trí thứ chín của nó được thay thế bởi D, F, G, I, L, N, S, V, W hoặc Y; (iv) D ở vị trí thứ nhất của CDR1 của chuỗi nặng được thay thế bởi G hoặc Q; Y ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi Q; hoặc I ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi A hoặc Q; (v) F ở vị trí thứ ba của CDR2 của chuỗi nặng được thay

thế bởi D, E, W hoặc Y; G ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi D, H hoặc Y; S ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi F, P, W hoặc Y; G ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi A, F, L, N hoặc T; N ở vị trí thứ tám của nó được thay thế bởi F, P, S, T hoặc Y; T ở vị trí thứ chín của nó được thay thế bởi A, D, E, F, G, H, L, P, S hoặc V; H ở vị trí thứ mười của nó được thay thế bởi A, D, F, M, R, S, T, V, W hoặc Y; F ở vị trí thứ mười một của nó được thay thế bởi G, H, I, L, M, N, P, Q, V hoặc Y; S ở vị trí thứ mười hai của nó được thay thế bởi A, D, G, H, I, L, P, T hoặc V; A ở vị trí thứ mười ba của nó được thay thế bởi D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, T, V hoặc Y; R ở vị trí thứ mười bốn của nó được thay thế bởi A, E, G, H, L, N, P, Q, S, W hoặc Y; F ở vị trí thứ mười lăm của nó được thay thế bởi D, E, G, L, M, P, R, S, V hoặc W; K ở vị trí thứ mười sáu của nó được thay thế bởi A, E, F, G, H, L, R, S, T, V hoặc Y; hoặc G ở vị trí thứ mười bảy của nó được thay thế bởi E, F, H, L, M, N, P, Q, R, S, T, V hoặc W; hoặc (vi) G ở vị trí thứ nhất của CDR3 của chuỗi nặng được thay thế bởi E, F, H, N, Q, V hoặc W; D ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi E; Y ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi L, Q, T hoặc V; G ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi W; F ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi L hoặc Y; L ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi Q, S hoặc Y; hoặc Y ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi C, L, M, N hoặc Q. Ở đây, sáng chế có thể đề xuất rằng CDR1 của chuỗi nhẹ bao gồm 0-5 sự thay thế, CDR2 của chuỗi nhẹ bao gồm 0-1 sự thay thế, CDR3 của chuỗi nhẹ bao gồm 0-7 sự thay thế, CDR1 của chuỗi nặng bao gồm 0-1 sự thay thế, CDR2 của chuỗi nặng bao gồm 0-11 sự thay thế, và CDR3 của chuỗi nặng bao gồm 0-6 sự thay thế.

Cụ thể là, theo phương án thực hiện mẫu khác nữa, sáng chế có thể đề xuất kháng thể được tối ưu hóa ái lực gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 229 đến SEQ ID NO: 268; CDR2 của chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 182 đến SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 227 và SEQ ID NO: 228; CDR3 của chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 142 đến SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 191 đến SEQ ID NO: 226 và SEQ ID NO: 269 đến SEQ ID NO: 301; và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 108 đến SEQ ID NO: 112; CDR2 của chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 54 đến SEQ ID NO: 63, SEQ ID

NO: 72 đến SEQ ID NO: 107 và SEQ ID NO: 118 đến SEQ ID NO: 141; CDR3 của chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 71 và SEQ ID NO: 113 đến SEQ ID NO: 117, cụ thể hơn là, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 306 đến SEQ ID NO: 311, và vùng biến đổi chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 302 đến SEQ ID NO: 305, và cụ thể hơn nữa là bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 302; (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 305; (c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 310 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23; (d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 308 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 305; (e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 306 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 303; (f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 307 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304; (g) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 308 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304; (h) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 309 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304; (i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 311 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304; hoặc (j) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 306 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 302, nhưng không giới hạn.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, phương pháp chọn lọc cạnh tranh được sử dụng để chọn lọc khác thể với ái lực được cải thiện nhiều hơn kháng thể được làm tương thích với người, qua đó thu được một số kháng thể được tối ưu hóa ái lực (Bảng 8-10 và 12). Kháng thể được tối ưu hóa ái lực có hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u hiệu quả gấp 4,3-28,5 lần so với kháng thể được làm tương thích với người (Bảng 11, 13 và Fig.3).

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó còn gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR) ngoài khả năng gắn được hiệu với c-Met.

EGFR vốn là một trong các ErbB tyrosin kinaza, đã được biết đến rằng được hoạt hóa bất thường trong nhiều khối u tế bào biểu mô bao gồm ung thư biểu mô phổi không tế bào nhỏ, dẫn đến sự tăng sinh tế bào, xâm lấn, di căn và hình thành mạch, và làm tăng sự sống của tế bào. Gefitinib (Iressa), elotinib (Tarceva) và osimertinib (Tagrisso), vốn là các chất ức chế EGFR tyrosin kinaza, được sử dụng làm tác nhân điều trị ung thư phổi điển hình; và cetuximab (Erbitux) và panitumumab (Vectibix), vốn là kháng thể hướng đích EGFR, được sử dụng làm tác nhân điều trị ung thư kết tràng (Yewale C và cộng sự, *Biomaterials*. 2013 34(34):8690-707 (2013), Deric L. Wheeler và cộng sự, *Nature Reviews Clinical Oncology* 7, 493-507 (2010)).

Các tác nhân trị liệu hướng đích EGFR dẫn đến sự kháng thuốc một năm trước và sau khi điều trị, trong đó sự khuếch đại, đột biến c-Met và sự hoạt hóa HGF được cảm ứng được biết đến là cơ chế kháng thuốc chính (Simona Corso *Cancer Discovery* 3:978-992 (2013), Curtis R Chong và cộng sự, *Nature Medicine* 19, 1389-1400 (2013)). Ngoài ra, cũng có báo cáo rằng EGFR và c-Met được biểu hiện đồng thời trong nhiều tế bào khối u khác nhau, trong đó, khi ức chế EGFR, c-Met được hoạt hóa, do đó nhanh chóng phát triển sự đề kháng của EGFR TKI (Engelman, J.A., và cộng sự, *Science*, 316:1039-43 (2007)).

Dựa vào cơ chế này, cách điều trị riêng lẻ bằng thuốc hướng đích c-Met và điều trị kết hợp với thuốc hướng đích EGFR đã được thử nghiệm lâm sàng, nhưng hiệu quả của chúng vẫn chưa được khẳng định là tác nhân điều trị, và yêu cầu đặt ra là cần thiết phải phát triển tác nhân điều trị dùng cho khối u ung thư liên quan đến c-Met, vốn được biết đến là nguyên nhân chính dẫn đến sự kháng thuốc. Theo đó, các tác giả sáng chế đã tạo ra kháng thể đặc hiệu kép c-Met/EGFR dựa vào kháng thể được mô tả trên đây. Kháng thể đặc hiệu kép không chỉ có hiệu quả ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u, vốn kháng lại tác nhân điều trị EGFR hiện nay, mà còn cho thấy hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tốt chống lại các tế bào khối u, do được này được sử dụng một cách có giá trị trong điều trị bệnh như các bệnh ung thư có liên quan đến c-Met thông qua nhiều cơ chế khác nhau.

Sáng chế đề xuất kháng thể kép được hiệu được tạo thành theo cách kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn đặc hiệu với EGFR được liên kết với một đầu

chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu c-Met, cụ thể là, được liên kết với đầu C của chuỗi nặng, nhưng không giới hạn.

Sáng chế đề xuất mảnh kháng thể gắn đặc hiệu với EGFR là Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc Fv.

Theo phương án thực hiện mẫu, sáng chế đề xuất Fv là mảnh scFv, trong đó mảnh scFv được liên kết bởi phần kết nối có khả năng liên kết mảnh scFv với một đầu của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể c-Met. Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, kháng thể gắn đặc hiệu với EGFR còn được tạo ra bằng cách liên kết với phần liên kết nêu trong SEQ ID NO: 312.

Sáng chế đề xuất mảnh scFv EGFR là scFv EGFR có khả năng gắn đặc hiệu với EGFR đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, trong đó có Erbitux, Vectibix, Portrazza, TheraCIM hoặc tương tự, nhưng không giới hạn.

Theo phương án thực hiện mẫu, sáng chế đề xuất EGFR scFv là mảnh Erbitux hoặc Vectibix scFv, cụ thể là EGFR scFv bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 313 hoặc SEQ ID NO: 314, trong đó Vectibix scFv bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 315, nhưng không giới hạn.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, kết quả xác minh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể đặc hiệu kép đã khẳng định rằng kháng thể có hiệu quả ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tốt hơn so với kháng thể được tối ưu hóa hu8C4 (Bảng 16 và 17, Fig.4, 5, 16 và 17). Cụ thể là, kết quả đã khẳng định rằng kháng thể của sáng chế có hiệu quả ức chế sự tăng sinh tế bào tốt hơn ngay cả đối với các dòng tế bào NCI-H292 và NCI-H1648, trong đó c-Met và EGFR thường được biểu hiện (Bảng 17 và 19 và Fig. 6). Dựa trên kết quả này, có thể thấy rằng tác dụng chống ung thư của kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể bởi sự bất biểu hiện bất thường của c-Met hoặc sự hiện diện hoặc vắng mặt của đột biến c-Met, v.v..

Hơn nữa, có thể khẳng định rằng kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tốt hơn liệu pháp kết hợp của hai kháng thể (Bảng 18-21 và Fig.6-8). Ngoài ra, kết quả kết quả xác định hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế đối với hoạt tính của kháng nguyên và vật liệu truyền tín hiệu, đã khẳng

định rằng kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế có hiệu quả ức chế truyền tín hiệu tốt hơn so với kháng thể đơn (Fig.11).

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn với vùng epitop được biểu diễn bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333 và/hoặc SEQ ID NO: 334. Kháng thể được tối ưu hóa ái lực được tạo ra dựa vào kháng thể nhất định (kháng thể tham chiếu) được đặc trưng bởi có tính tương đồng cao với trình tự CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng liên quan đến kháng thể tham chiếu, do đó gắn với cùng một vùng epitop như kháng thể tham chiếu, do đó kháng thể được tối ưu hóa ái lực có thể được kế thừa tất cả các đặc tính sinh học như cơ chế được lý và hiệu quả được lý gây ra bởi vị trí gắn, tính đặc hiệu và kháng thể, và thể hiện hiệu quả tốt hơn về ái lực gắn so với kháng thể tham chiếu.

Vùng epitop tương ứng có nghĩa là, YVSKPGAQL (ID SEQ NO: 331) ở vị trí thứ 321 đến thứ 329, IGASLNDDI (ID SEQ NO: 332) ở vị trí thứ 333 đến 341, PIKYVND (ID SEQ NO: 333) ở vị trí thứ 36 đến 372 và QVVVSRSGPST (SEQ ID NO: 334) ở vị trí 464 đến 474 từ đầu N của kháng nguyên c-Met tham chiếu (SEQ ID NO: 335), trong đó trình tự kháng nguyên c-Met cùng với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế gắn vào đó bao gồm đột biến một phần (thay thế, thêm hoặc mất) hoặc kháng nguyên liên kết tồn tại dưới dạng mảnh c-Met, tiền chất hoặc phân nhóm, do đó vị trí hoặc trình tự gắn của nó có thể thay đổi nhỏ. Tuy nhiên, người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rõ rằng vị trí và trình tự mà kháng nguyên hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế gắn vào dựa trên thông tin trình tự epitop của kháng nguyên c-Met tham chiếu.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, có thể xác định được rằng kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix scFv của sáng chế gắn với 4 vùng epitop gồm Y321 - L329 (SEQ ID NO: 331), I333 - I341 (SEQ ID NO: 332), P366 - D372 (SEQ ID NO: 333), và Q464 - S474 (SEQ ID NO: 334) của chuỗi β miền sema c-Met người (Bảng 28).

“Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn đặc hiệu với c-Met” của sáng chế có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn với c-Met người bởi K_D 1×10^{-7} M hoặc ít hơn. Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên

của nó gắn với c-Met người, cụ thể là bởi K_D 5×10^{-8} M hoặc ít hơn, K_D 1×10^{-8} M hoặc ít hơn, K_D 5×10^{-9} M hoặc ít hơn, hoặc K_D 1×10^{-9} M hoặc ít hơn, nhưng không giới hạn.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, có thể xác định được rằng kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế có ái lực gắn cao với kháng nguyên c-Met bằng cách xác định ái lực gắn của hu8C4, hu8C4 AH71 và hu8C4 x Vectibix scFv với c-Met ECD, do đó các định các giá trị K_D tương ứng $3,173 \times 10^{-10}$, $9,993 \times 10^{-11}$ và $2,78 \times 10^{-10}$ (Bảng 22). Có thể xác định được rằng kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế có khả năng phản ứng chéo với kháng thể c-Met của khỉ đuôi dài (Bảng 22), nhưng không gắn với các kháng nguyên có nguồn gốc động vật hác (cụ thể như có nguồn gốc từ loài gặm nhấm) (Fig.9). Ngoài ra, có thể xác định được rằng kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế không gắn với các thụ thể khác trên bề mặt tế bào ngoài c-Met (Bảng 24). Do đó, kết quả trên đây cho thấy rằng, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế thể hiện tính đặc hiệu gắn với kháng nguyên c-Met của người và khỉ.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hằng số gắn (K_{on})” có nghĩa là tỷ lệ gắn của tương tác kháng thể-kháng nguyên nhất định, và thuật ngữ “hằng số phân ly (K_{off})” có nghĩa là tỷ lệ phân ly của tương tác kháng nguyên-kháng thể nhất định. Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ “ái lực với kháng nguyên (K_D)” có nghĩa là tỷ lệ $K_{off} : K_{on}$ được biểu thị dưới dạng nồng độ mol phân tử (M). Sáng chế đề xuất giá trị K_D cho kháng thể được đo bằng cách sử dụng phương pháp được công nhận rộng rãi trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể là, phương pháp đo giá trị K_D của kháng thể có thể được cung cấp bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt bằng hệ thống Biocore™, nhưng không giới hạn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử axit nucleic để mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic, tế bào chủ có vector biểu hiện được đưa vào, kháng thể sử dụng tế bào chủ hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử axit nucleic” có nghĩa là bao gồm toàn bộ các phân tử ADN và ARN, trong đó nucleotit, đơn vị cấu tạo cơ bản trong phân tử axit nucleic, không chỉ bao gồm các nucleotit tự nhiên, mà còn bao gồm các phân tử

tương tự, trong đó đường hoặc phần bazơ được cải biến (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman và Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584). Trình tự phân tử axit nucleic mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cả sáng chế có thể được sửa đổi, trong đó việc sửa đổi bao gồm thêm, bớt, hoặc thay thế nucleotit bảo thủ hoặc không bảo thủ.

Cần hiểu rằng, phân tử axit nucleic của sáng chế cũng bao gồm trình tự nucleotit cơ bản tương đồng với trình tự nucleotit đã đề cập trên đây. Theo sáng chế, trong trường hợp sắp xếp trình tự nucleotit nói trên của sáng chế với trình tự bất kỳ khác theo cách tương ứng nhất và phân tích trình tự bằng thuật toán thông thường trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, cơ bản tương đồng có nghĩa là trình tự nucleotit tương đồng tối thiểu 80%, tốt hơn là tương đồng tối thiểu 90%, tốt hơn nữa là tương đồng tối thiểu 95%.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” là phương tiện để biểu hiện gen đích trong tế bào chủ, bao gồm vector plasmit; vector cosmit; và vector virus như vector thể thực khuẩn, vector adenovirus, vector retrovirus, và virus liên quan đến adeno, tốt hơn là vector plasmit, nhưng không giới hạn.

Vector của sáng chế có thể bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết hoạt động với vùng khởi động.

Trong sáng chế, thuật ngữ “liên kết hoạt động” có nghĩa là liên kết chức năng giữa trình tự điều hòa biểu hiện axit nucleic (cụ thể là vùng khởi động, trình tự tín hiệu, hoặc một mảng trong vị trí gắn yếu tố điều hòa phiên mã) và trình tự axit nucleic khác, do đó trình tự điều hòa điều khiển phiên mã và/hoặc giải mã trình tự axit nucleic khác.

Hệ thống vector tái tổ hợp của sáng chế có thể được xây dựng thông qua nhiều phương pháp khác nhau đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể là, phương pháp chi tiết đã được bộc lộ trong Sambrook và cộng sự, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), tài liệu được kết hợp ở đây dưới dạng tham khảo.

Vector của sáng chế có thể được xây dựng điển hình như vector dùng để nhân dòng hoặc vector dùng để biểu hiện. Ngoài ra, vector của sáng chế có thể được xây dựng theo cách tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thật là tế bào chủ.

Cụ thể là, nếu vector của sáng chế là vector biểu hiện và tế bào nhân sơ là tế bào chủ, vector thường bao gồm vùng khởi động mạnh có khả năng thực hiện phiên mã (cụ thể như vùng khởi động tac, vùng khởi động lac, vùng khởi động lacUV5, vùng khởi động lpp, vùng khởi động pLλ, vùng khởi động pRλ, vùng khởi động rac5, vùng khởi động amp, vùng khởi động recA, vùng khởi động SP6, vùng khởi động trp, vùng khởi động T7 và tương tự), vị trí liên kết ribosom để bắt đầu giải mã và phiên mã/giải mã trình tự kết thúc. Nếu *E. coli* (cụ thể là HB101, BL21, DH5α, v.v.) được sử dụng làm tế bào chủ, thì vùng khởi động và vùng điều khiển của con đường tổng hợp tryptophan *E. coli* (Yanofsky, C., J. Bacteriol., (1984) 158:1018-1024), và vùng khởi động bên trái của thể thực khuẩn λ (pLλ promotor, Herskowitz, I. và Hagen, D., Ann. Rev. Genet., (1980) 14:399-445) có thể được sử dụng làm phần điều hòa. Nếu *Bacillus* sp. được sử dụng làm tế bào chủ, thì vùng khởi động của gen protein độc của *Bacillus thuringiensis* (Appl. Environ. Microbiol. (1998) 64:3932-3938; Mol. Gen. Genet. (1996) 250:734-741) hoặc vùng khởi động bất kỳ có thể biểu hiện trong *Bacillus* sp. có thể được sử dụng làm phần điều hòa.

Trong khi đó, vector tái tổ hợp của sáng chế có thể được sản xuất bằng cách chỉnh sửa plasmit (cụ thể như pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCF79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, nhóm pGEX, nhóm pET, pUC19 và tương tự), thể thực khuẩn (cụ thể như λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1, M13 và tương tự) hoặc virus (cụ thể như SV40, v.v.) thường được sử dụng.

Trong khi đó, nếu vector của sáng chế là vector biểu hiện và tế bào nhân thật là tế bào chủ, thì vùng khởi động có nguồn gốc từ hệ gen của tế bào động vật có vú (cụ thể như vùng khởi động metallothionein, vùng khởi động β-actin, vùng khởi động hemoglobin người, và vùng khởi động creatin cơ người) hoặc vùng khởi động có nguồn gốc từ virus động vật (cụ thể là vùng khởi động muộn adenovirus, vùng khởi động 7,5k virus vaccinia, vùng khởi động SV40, vùng khởi động cytomegalovirus (CMV), vùng khởi động tk của HSV, vùng khởi động của virus Moloney, vùng khởi động của virus Epstein-barr (EBV) và vùng khởi động của virus Rous sarcoma (RSV)) có thể được sử dụng, trong đó chúng thường có trình tự polyadenyl hóa là trình tự kết thúc phiên mã. Cụ thể, vector tái tổ hợp của sáng chế bao gồm vùng khởi động CMV.

Vector tái tổ hợp của sáng chế có thể được dung hợp với các trình tự khác để tạo điều kiện cho việc tinh chế kháng thể được biểu hiện trong đó. Ví dụ về các trình tự dung hợp gồm glutathion S-transferaza (pharmacia, Mỹ), protein gắn maltoza (NEB, Mỹ), FLAG (IBI, Mỹ), 6x His (hexahistidin; Quiagen, Mỹ) và tương tự. Ngoài ra, protein được biểu hiện bởi vector của sáng chế là kháng thể, do đó kháng thể được biểu hiện có thể dễ dàng được tinh chế qua cột protein A, v.v., mà không cần chuỗi bổ sung để tinh chế.

Trong khi đó, vector tái tổ hợp của sáng chế bao gồm một gen kháng kháng sinh thường được sử dụng trong kỹ thuật làm chất chỉ thị chọn lọc, trong đó gen kháng kháng sinh có thể bao gồm, gen kháng ampicilin, gentamixin, carbenxilin, chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, genin và tetracyclin.

Vector để biểu hiện kháng thể của sáng chế, có thể có cả hệ thống vector trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được biểu hiện đồng thời trong cùng một vector, và hệ thống vector trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện tương ứng ở các vector riêng biệt. Trong trường hợp hệ thống vector biểu hiện riêng biệt, hai vector có thể được đưa vào một tế bào chủ, cụ thể là thông qua đồng biến nạp hoặc biến nạp hướng đích. Đồng biến nạp là phương pháp lựa chọn tế bào biểu hiện cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ sau khi đưa đồng thời từng ADN vector mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng vào tế bào chủ. Biến nạp hướng đích là phương pháp lựa chọn tế bào được biến nạp vector chứa chuỗi nhẹ (hoặc chuỗi nặng) và lại biến nạp tế bào được lựa chọn với vector chứa chuỗi nặng (hoặc chuỗi nhẹ) để cuối cùng lựa chọn tế bào biểu hiện cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Miễn là chúng có khả năng được làm tương thích với người ổn định và liên tục và biểu hiện vector của sáng chế, tế bào chủ bất kỳ đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng, trong đó tế bào chủ có thể bao gồm *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. như *Bacillus subtilis* và *Bacillus thuringiensis*, và tế bào chủ nhân sơ như *Streptomyces*, *Pseudomonas* (cụ thể như *Pseudomonas putida*), *Proteus mirabilis* hoặc *Staphylococcus* (cụ thể như *Staphylococcus carnosus*), nhưng không giới hạn.

Tế bào chủ nhân thật phù hợp của vector có thể là các loại nấm như *Aspergillus species*, nấm men như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* và *Neurospora crassa*, các tế bào nhân thật bậc thấp khác, các tế

bào nhân thật bậc cao như tế bào có nguồn gốc côn trùng, tế bào có nguồn gốc thực vật hoặc động vật có vú.

Cụ thể là, tế bào chủ có thể là tế bào COS7 (tế bào thận khỉ), tế bào NSO, SP2/0, tế bào buồng trứng chuột đồng trung quốc (CHO), W138, tế bào thận chuột đồng non (BHK), MDCK, tế bào dòng tủy, tế bào HuT 78 hoặc tế bào 293, tốt hơn là tế bào CHO, nhưng không giới hạn.

Theo sáng chế, “chuyển nạp” và/hoặc “chuyển nhiễm” vào tế bào chủ có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp theo tế bào chủ đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phương pháp bất kỳ để đưa axit nucleic vào sinh vật, tế bào, mô hoặc cơ quan. Phương pháp bao gồm điện dịch chuyển, kết hợp chất nguyên sinh, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), khuấy trộn sử dụng sợi silic carbua, chuyển nạp qua trung gian *Agrobacteria*, PEG, dextran sulfat, lipofectamin, chuyển nạp qua trung gian làm khô/ức chế và tương tự, nhưng không giới hạn.

Theo sáng chế, phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó sử dụng tế bào chủ bao gồm các bước: (a) nuôi cấy tế bào được chuyển nạp vector tái tổ hợp của sáng chế; và (b) biểu hiện kháng thể kháng c-Met hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trong tế bào chủ.

Trong quá trình sản xuất kháng thể trên đây, công đoạn nuôi cấy tế bào chủ được chuyển nạp có thể được thực hiện trong môi trường thích hợp và ở điều kiện nuôi cấy đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Quy trình nuôi cấy có thể được điều chỉnh dễ dàng theo chủng được chọn bởi những người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Phương pháp nuôi cấy được mô tả trong nhiều tài liệu khác nhau (cụ thể như James M. Lee, *Biochemical Engineering*, Prentice-Hall International Editions, 138-176). Cách nuôi cấy tế bào có thể được chia thành nuôi cấy huyền phù và nuôi cấy giá thể tùy theo kiểu sinh trưởng tế bào, và nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy cho ăn theo mẻ và nuôi cấy liên tục theo phương pháp nuôi cấy. Môi trường được sử dụng trong nuôi cấy phải đáp ứng được yêu cầu của chủng nhất định. Trong nuôi cấy tế bào động vật, môi trường bao gồm các nguồn cacbon, nguồn nitơ, và các thành phần vi lượng. Ví dụ về nguồn cacbon hữu dụng có thể bao gồm cacbohydrat như glucoza, sucroza, lactoza, fructoaz, maltoza, tinh bột và xenluloza; chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương,

dầu thầu dầu và dầu dừa; axit béo như axit palmitic, axit stearic, axit linoleic; rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit axetic, trong đó nguồn cacbon có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp.

Nguồn nitơ có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm nguồn nitơ hữu cơ như pepton, cao nấm men, nước thịt, cao mạch nha, nước luộc ngô (CSL) và đậu tương-lúa mì, và nguồn nitơ vô cơ như ure, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat, trong đó các nguồn nitơ có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp. Nguồn phospho cho môi trường có thể bao gồm kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat và muối chứa natri tương ứng của nó. Ngoài ra, môi trường có thể bao gồm muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat. Bên cạnh đó, môi trường có thể bao gồm các axit amin, vitamin, các tiền chất thích hợp và các chất cần thiết khác.

Trong quá trình nuôi cấy, các hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoni, axit phosphoric và axit sulfuric được thêm vào sản phẩm nuôi cấy theo cách thích hợp để điều chỉnh pH của sản phẩm nuôi cấy. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, sự tạo bọt có thể được ức chế bằng cách sử dụng chất khử bọt như este polyglycol axit béo. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy (cụ thể như không khí) có thể được bơm vào sản phẩm nuôi cấy để duy trì trạng thái hiếu khí của sản phẩm nuôi cấy. Nhiệt độ của sản phẩm nuôi cấy thường khoảng 20-45°C, tốt nhất là 25-40°C.

Phương pháp sản xuất có thể còn bao gồm thêm bước: (c) thu kháng thể kháng c-Met hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được biểu hiện trong tế bào chủ. Kháng thể thu được bằng cách nuôi cấy tế bào chủ được chuyển nạp có thể được sử dụng ở trạng thái không tinh chế, hoặc được sử dụng ở trạng thái đã tinh chế với độ tinh khiết cao sử dụng các phương pháp thông thường khác nhau, cụ thể như, thẩm tách, kết tủa bằng muối, sắc ký và phương pháp tương tự khác. Trong các phương pháp này, phương pháp sắc ký thường được sử dụng phổ biến nhất, trong đó loại và thứ tự cột có thể được chọn từ sắc ký trao đổi ion, sắc ký rây phân tử, sắc ký ái lực, v.v., tùy thuộc đặc tính của kháng thể, phương pháp nuôi cấy, v.v..

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm phát hiện c-Met, bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bộ kit phát hiện bao gồm chế phẩm này, và phương pháp phát hiện kháng nguyên c-Met sử dụng chế phẩm này.

Chế phẩm phát hiện c-Met và kit bao gồm chế phẩm này tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể theo cách kháng thể gắn đặc hiệu với c-Met hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó đi vào tiếp xúc với mẫu bệnh phẩm, do đó phát hiện có hiệu quả c-Met.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phức hợp kháng nguyên-kháng thể” có nghĩa là liên hợp giữa c-Met và kháng thể nhận diện c-Met, để xác định khối u hoặc tế bào ung thư biểu hiện c-Met trong mẫu.

Phương pháp định lượng kháng nguyên c-Met bằng cách sử dụng chế phẩm để phát hiện c-Met và sử dụng bộ kit bao gồm chế phẩm này có thể được thực hiện bằng cách xác định sự hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể, trong đó việc xác định sự hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể được thực hiện bằng xét nghiệm miễn dịch enzym (ELISA), western blot, huỳnh quang miễn dịch, nhuộm hóa mô miễn dịch, phân tích tế bào theo dòng chảy, hóa mô miễn dịch, xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), xét nghiệm kết tủa miễn dịch, xét nghiệm khuếch tán miễn dịch, xét nghiệm cố định bổ thể, chíp protein, v.v., nhưng không giới hạn. ELISA bao gồm nhiều phương pháp ELISA khác nhau như ELISA trực tiếp sử dụng kháng thể đánh dấu để nhận diện kháng nguyên gắn với giá thể rắn; ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu để nhận diện kháng thể bắt trong phức hợp của kháng thể để nhận diện kháng nguyên được gắn với giá thể rắn; ELISA kẹp trực tiếp sử dụng kháng thể được đánh dấu khác để nhận diện kháng nguyên trong phức hợp của kháng thể và kháng nguyên gắn với giá thể rắn; và ELISA kẹp gián tiếp sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu để phản ứng với kháng thể khác để nhận diện kháng nguyên trong phức hợp của kháng thể và kháng nguyên gắn với giá thể rắn rồi nhận diện kháng thể, v.v..

Nhãn đánh dấu để định lượng sự hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể đo được, có thể là enzym, vật liệu huỳnh quang, phối tử, vật liệu phát sáng, vi hạt, phân tử oxy hóa khử, đồng vị phóng xạ và phân tử tương tự khác, nhưng không giới hạn. Enzym đánh dấu có thể là β -glucuronidaza, β -D-glucosidaza, β -D-galactosidaza, ureaza, peroxidaza, phosphataza kiềm, axetylcholinesteraza, glucoza oxidaza, hexokinaza và GDPaza, ARNaza, glucoza oxidaza và luciferaza, phosphofructokinaza, phosphoenolpyruvat cacboxylaza, aspartat aminotransferaza, phosphoenolpyruvat decacboxylaza, β -lactamaza, v.v, nhưng không giới hạn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị ung thư, chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phòng hoặc điều trị ung thư, phương pháp bao gồm bước sử dụng chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế cho người bị có nguy cơ phát triển ung thư hoặc mắc bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất sử dụng chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế trong điều trị ung thư, và trong sản xuất thuốc chống ung thư.

Kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên của nó đã được mô tả trên đây.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế có khả năng gắn riêng với c-Met hoặc tổ hợp của c-Met và EGFR với ái lực cao để ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư, cụ thể là kháng thể đơn giản hoặc kết hợp với các chất mang được dùng thông thường có thể được sử dụng trong điều trị, phòng và chẩn đoán các bệnh tăng sinh như ung thư.

Theo sáng chế, thuật ngữ “phòng” có nghĩa là mọi tác động ngăn ngừa hoặc trì hoãn các bệnh như ung thư, v.v., xảy ra hoặc tái phát bằng cách sử dụng chế phẩm của sáng chế, và thuật ngữ “điều trị” có nghĩa là ức chế sự phát triển của bệnh như ung thư, làm giảm ung thư hoặc loại bỏ ung thư.

Các bệnh ung thư có thể sử dụng chế phẩm của sáng chế bao gồm ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC), u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư tuyến tụy, ung thư đầu và cổ, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô, ung thư tuyến nước bọt hoặc ung thư tuyến giáp, tốt là ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC), ung thư tuyến tụy, ung thư đầu và cổ, ung thư vú, và tốt hơn nữa là ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC), u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư tuyến tụy, ung thư đầu và cổ, nhưng không giới hạn. Theo sáng chế, ung thư có thể bị gây ra bởi, sự biểu hiện quá mức, sự khuếch đại, đột biến hoặc hoạt hóa c-Met, nhưng không giới hạn. Nói cách khác, chế phẩm bao gồm kháng thể

hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế có hiệu quả ức chế sự tăng sinh của mọi tế bào khối u ung thư bất kể sự biểu hiện bất thường hoặc đột biến của c-Met, do đó việc sử dụng dược phẩm của sáng chế không bị giới hạn bởi khía cạnh biểu hiện hay có mặt, vắng mặt của đột biến c-Met.

Chế phẩm có thể tạo thành chế phẩm dược, chế phẩm thuốc tác dụng nhẹ và chế phẩm cho thực phẩm chức năng.

Chế phẩm của sáng chế dùng để phòng hoặc điều trị ung thư còn có thể bao gồm thêm chất mang dược dụng. Chất mang dược dụng là loại thường được sử dụng trong bào chế công thức, bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, cao su acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, xenluloza, nước, xi-rô, metylxenluloza, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, bột tan, magie stearat, dầu khoáng và chất tương tự khác, nhưng không giới hạn. Bên cạnh các thành phần, chế phẩm của sáng chế dùng để phòng hoặc điều trị ung thư còn có thể bao gồm chất làm trơn, chất làm ẩm, chất tạo ngọt, chất tạo hương, chất nhũ hóa, chất tạo huyền phù, chất bảo quản, v.v.. Các chất mang dược dụng phù hợp và quá trình bào chế được mô tả chi tiết trong Khoa học dược phẩm Reminton (tái bản lần thứ 19, 1995).

Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng bằng đường uống hoặc ngoài đường tiêu hóa, trong đó sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được thực hiện bằng truyền dưới da, truyền tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm trong màng bụng, tiêm nội mô, bôi tại chỗ, hít, khí dung, đặt hậu môn, và cách sử dụng tương tự khác. Trong quá trình sử dụng qua đường miệng, protein hoặc peptit được tiêu hóa, vì vậy chế phẩm dạng uống có thể được công thức hóa theo cách thuốc hoạt tính của nó được phủ hoặc được bảo vệ khỏi sự phân hủy trong dạ dày. Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng bằng thiết bị xác định trước mà nhờ đó hoạt chất có thể được chuyển vào tế bào đích.

Liều lượng phù hợp của chế phẩm theo sáng chế để phòng hoặc điều trị ung thư thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như phương pháp bào chế, con đường sử dụng, tuổi, thể trọng, giới tính, tình trạng bệnh tật, chế độ ăn, thời gian dùng thuốc, của người bệnh, con đường sử dụng thuốc, tốc độ bài tiết và độ miễn cảm đáp ứng của người bệnh, trong đó bác sỹ có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng xác định và kê đơn liều hiệu quả để phòng hoặc điều trị theo ý muốn. Theo phương án thực hiện

mẫu của sáng chế, liều hàng ngày của chế phẩm được của sáng chế có thể trong khoảng 0,001-100 mg/kg trở lên. Theo sáng chế, thuật ngữ “liệu có hiệu quả dược lý” có nghĩa là lượng đủ để điều trị, phòng và chẩn đoán bệnh như ung thư.

Chế phẩm của sáng chế dùng để phòng hoặc điều trị ung thư có thể được công thức hóa thành dược phẩm bằng cách sử dụng chất mang được dụng và/hoặc tá dược được dụng theo phương pháp có thể được thực hiện dễ dàng bởi người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Chế phẩm có thể được bào chế thành dạng liều đơn hoặc được bào chế bằng cách cho vào vỏ đựng liều đa. Đồng thời, dạng liệu có thể ở dạng dung dịch trong dầu hoặc nước, huyền dịch hoặc nhũ tương, hoặc ở dạng dịch chiết, bột, thuốc đạn, thuốc bột, hạt nhỏ, viên nén hoặc viên nang và còn có thể bao gồm thêm chất phân tán hoặc chất ổn định.

Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng làm tác nhân trị liệu riêng lẻ hoặc được sử dụng kết hợp với các tác nhân trị liệu khác, và có thể được sử dụng tuần tự hoặc đồng thời với các tác nhân trị liệu thông thường.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị ung thư theo cách nó được tiêm vào cơ thể dưới dạng tác nhân điều trị kháng thể (phân tử chức năng) và liên hợp tác nhân điều trị kháng thể đặc hiệu kép (phân tử chức năng) đã được mô tả trên đây. Các điều kiện khác nhau phù hợp và mong muốn để hướng đích một loại thuốc đến vị trí đích đặc hiệu được trình bày trong tài liệu, cụ thể là Trouet và cộng sự, Plenum Press, New York và London, (1982) 19-30.

Theo phương án thực hiện cụ thể của sáng chế, do kết quả xác định hoạt tính chống ung thư của chế phẩm theo sáng chế dùng để phòng hoặc điều trị ung thư ở mô hình chuột ghép ngoại lai, có thể xác định được rằng hiệu quả ức chế hoạt tính khối u của nó tốt hơn đáng kể so với nhóm đối chứng (Fig.12 và 13).

c-Met, được hướng đích bởi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có trong chế phẩm của sáng chế là phân tử được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư, do đó có thể được sử dụng trong phòng, điều trị và chẩn đoán ung thư liên quan đến c-Met theo cách phân tử chức năng còn được gắn với kháng thể của sáng chế hoặc được sử dụng kết hợp. Phân tử chức năng có thể bao gồm hoạt chất, đồng vị phóng xạ, yếu tố trị liệu miễn dịch, xytokin, chemokin, độc, tác nhân sinh học, chất ức chế enzym và chất tương tự khác.

Phân tử chức năng có khả năng gắn với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế dẫn đến liên hợp thuốc kháng thể (ADC) có thể là hợp chất hóa học, xytokin hoặc chemokin, nhưng không giới hạn. Hợp chất hóa học có thể là loại thuốc chống ung thư, cụ thể như acivicin, aclarubicin, acodazol, acronycin, adozelesin, alanosin, aldesleukin, natri alopurinol, altretamin, aminoglutethimit, amonafit, ampligen, amsacrin, androgen, anguidin, aphidicolin glyxinat, asaley, asparaginaza, 5-azacytidin, azathioprin, *Bacillus calmette-guerin* (BCG), Baker's antifol, beta-2-dioxythioguanosin, bisantren HCl, bleomycin sulfat, bulsufan, buthionin sulfoximin, BWA773U82, BW502U83/HCl, BW 7U85 mesylat, ceracemit, carbetim, carboplatin, carmustin, chlorambucil, chloroquinoxalin-sulfonamt, chlorozotocin, chromomycin A3, cisplatin, cladribine, corticosteroid, *Corynebacterium parvum*, CPT-11, crisnatol, xyclocytidin, xyclophosphamit, cytarabin, cytembena, dabis maleat, decarbazin, dactinomycin, daunorubicin HCl, dezaauridin, dexrazoxan, dianhydro galactitol, diaziquon, dibromodulcitol, didemnin B, dietyldithio carbamat, diglycoaldehyt, dihydro-5-azacytidin, doxorubicin, echinomycin, dedatrexat, edelfosin, eflornithin, dung dịch Elliot, elsamitrucin, epirubicin, esorubicin, estramustin phosphat, estrogen, etanidazol, ethiopho, etopot, fadrazol, fazarabin, fenretinit, filgrastim, finasterit, axit axetic flavon, floxuridin, fludarabin phosphat, 5'-floracil, Fluosol™, flutamit, gali nitrat, gemcitabin, goserelin axetat, hepsulfam, hexametylen bisacetamit, homoharringtonin, hydrazin sulfat, 4-hydroxyandrostenedion, hydroxyure, idarubicin HCl, ifosfamid, 4-ipomeanol, iproplatin, isotretinoin, leucovorin canxi, leuprolit axetat, levamisol, liposomal daunorubicin, doxorubicin bắt liposom, lomustin, lonidamin, maytansin, mechlorethamin hydroclorua, melphalan, menogaril, merbaron, 6-mercaptopurin, mesna, chất chiết bằng metanol của *Bacillus calmette-guerin*, methotrexat, N-metylformamit, mifepriston, mitoguazon, mitomycin-C, mitotan, mitoxantron hydroclorua, yếu tố kích thích khuẩn lạc đơn bào/đại thực bào, nabilon, nafoxidin, neocarzinostatin, octreotit axetat, ormaplatin, oxaliplatin, paclitaxel, pala, pentostatin, piperazindion, pipobroman, pirarubicin, piritrexim, piroxantron hydroclorua, PIXY-321, plicamycin, natri porfime, prednimustin, procarbazin, progestin, pyrazofurin, razoxan, sargramostim, semustin, spirogermanium, spiromustin, streptonigrin, streptozocin, sulofenur, natri suramin, tamoxifen, taxorene, tegafur, teniposit, terephthalamidin, teroxiron, thioguanin, thiotepa, ống tiêm thymidin, tiazofurin,

topotecan, toremifen, tretinoin, trifluoperazin hydroclorua, trifluridin, trimetrexat, yếu tố hoại tử khối u (TNF), uracil mù tạt, vinblastin sulfat, vincristin sulfat, vindesin, vinorelbin, vinzolidin, Yoshi 864, zorubicin, cytosin arabinosit, etoposit, melphalan, taxotere, taxol và hỗn hợp của chúng, nhưng không giới hạn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị minh họa kết quả thử nghiệm trong ống nghiệm (*in vitro*) đối với hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể c-Met lai theo sáng chế;

Fig.2 là hình minh họa vector dùng để biểu hiện bản sao riêng biệt cho sự biểu hiện scFv;

Fig.3 là đồ thị minh họa kết quả phân tích hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bởi kháng thể được tối ưu hóa ái lực tạo hu8C4 của sáng chế;

Fig.4 là đồ thị minh họa kết quả phân tích hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bởi kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế;

Fig.5 là đồ thị minh họa kết quả phân tích hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bởi kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế;

Fig.6 là đồ thị minh họa kết quả so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u giữa kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế và liệu pháp kết hợp ở các dòng tế bào U-87 MG (u nguyên bào đệm), NCI-H292 (NSCLC), NCI-H1648 (NSCLC) và NCI-H596 (NSCLC);

Fig.7 là đồ thị minh họa kết quả so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u giữa kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế và liệu pháp kết hợp ở các dòng tế bào LS174T (kết tràng), BT20 (TNBC) và KP4 (tụy);

Fig.8 là đồ thị minh họa kết quả so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u giữa kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế và liệu pháp kết hợp ở các dòng tế bào HCC827 (NSCLC) và NCI-H596 (NSCLC);

Fig.9 là đồ thị minh họa kết quả đo khả năng gắn của kháng thể kháng c-Met và kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế liên quan đến các loại kháng nguyên c-Met và EGFR khác nhau bằng phương pháp ELISA;

Fig.10 là biểu đồ minh họa kết quả đo hiệu quả làm giảm mức thụ thể bằng kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế ở dòng tế bào NCI-H820 (NSCLC);

Fig.11 là hình minh họa kết quả đo sự ức chế phosphoryl hóa c-Met và EGFR bởi kháng thể kháng c-Met và kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế ở dòng tế bào NCI-H820 (NSCLC);

Fig.12 là đồ thị minh họa kết quả đo tác dụng chống ung thư của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế ở mô hình ghép ngoại lai tế bào U-87 MG (u nguyên bào đệm);

Fig.13 là đồ thị minh họa kết quả đo tác dụng chống ung thư của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế ở mô hình ghép ngoại lai tế bào NCI-H820 (NSCLC);

Fig.14 là đồ thị minh họa kết quả phân tích hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u do xử lý kháng thể kháng c-Met của sáng chế và kháng thể kháng HER2 bằng liệu pháp kết hợp ở dòng tế bào NCI-H2170 (NSCLC);

Fig.15 là đồ thị minh họa kết quả đo tác dụng chống ung thư của liệu pháp kết hợp với kháng thể kháng c-Met của sáng chế và kháng thể kháng HER2 ở mô hình ghép ngoại lai tế bào NCI-H2170 (NSCLC);

Fig.16 là đồ thị minh họa kết quả đo tác dụng chống ung thư của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế ở mô hình ghép ngoại lai tế bào NCI-H596 (NSCLC);

Fig.17 là đồ thị minh họa kết quả đo tác dụng chống ung thư của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế ở mô hình ghép ngoại lai tế bào EBC-1 (NSCLC);

Fig.18 là đồ thị minh họa kết quả cho thấy lượng c-Met trên bề mặt tế bào đo được sau khi xử lý dòng tế bào HCC827 bằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv);

Fig.19 là biểu đồ minh họa kết quả cho thấy lượng EGFR trên bề mặt tế bào đo được sau khi xử lý dòng tế bào HCC827 bằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv);

Fig.20 là biểu đồ minh họa kết quả cho thấy quyết định kháng nguyên (epitop) của kháng thể đặc hiệu kép ở cấu trúc bậc ba, được phân tích bằng khối phổ trao đổi hydrođoteri (HDX-MS).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Các ví dụ sau đây được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế một cách chi tiết hơn để người

có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rõ sáng chế, mà không giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Chuẩn bị tế bào lai để sản xuất kháng thể đặc hiệu c-Met và xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của chúng

(1) Chuẩn bị và chọn lọc dòng tế bào lai để sản xuất kháng thể đơn dòng cho protein c-Met

Protein dung hợp miền Sema c-Met người/Fc (tự sản xuất) được tiêm trong màng bụng dưới dạng kháng nguyên vào chuột, để thu được chuột được gây miễn dịch cần thiết để phát triển dòng tế bào lai thông qua gây miễn dịch động vật. Quá trình sàng lọc được thực hiện thông qua phương pháp phân tích ELISA sử dụng protein dung hợp c-Met người/His làm kháng nguyên, để chọn lọc tế bào lai chỉ đáp ứng đặc hiệu với protein c-Met trong nhóm tế bào lai.

(2) c-Met kháng thể

Trình tự axit amin CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể chuột thu được từ dòng tế bào lai đã chọn lọc được trình bày tương ứng trên Bảng 1 và 2.

Bảng 1. CDR của chuỗi nhẹ lai

Kháng thể	CDR 1	SEQ ID NO	CDR 2	SEQ ID NO	CDR 3	SEQ ID NO
8C4	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
5G3	SATSSVRYMY	4	DTSNLAS	5	QQWSSYPRT	6

Bảng 2. CDR của chuỗi nặng lai

Kháng thể	CDR 1	SEQ ID NO	CDR 2	SEQ ID NO	CDR 3	SEQ ID NO
8C4	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLY	9
5G3	DYTLH	10	YINPYSGYTNYNQKFKD	11	GHMDY	12

(3) Hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* của kháng thể C-met lai

Liên quan đến kháng thể chuột đặc hiệu c-Met thu được từ dòng tế bào lai cũng như kháng thể khảm được tạo ra bằng cách dung hợp kháng thể với các vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người, hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u đã được thử nghiệm trong dòng tế bào u nguyên bào đệm ở người U-87 MG và dòng tế bào ung thư dạ dày ở người MKN45.

Cụ thể là, cá tế bào U-87 MG (ATCC, #HTB14) đã được pha loãng trong môi trường nuôi cấy EMEM (ATCC, #30-2003) chứa 10% (v/v) FBS, penixilin 100 U/500 ml và 100 µg/500 ml streptomycin (Invitrogen, #15140-122), sau đó các tế bào thu được này được thêm 100 µl vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng ở nồng độ $2,5 \times 10^3$ tế bào, đĩa được nuôi cấy ở 37°C, độ ẩm tương đối (RH) 95% và 5% (v/v) CO₂ trong 18-24 giờ. Môi trường nuôi cấy tế bào được loại bỏ khỏi mỗi giếng, sau đó môi trường EMEM chứa 2% (v/v) FBS được thêm 100 µl vào mỗi giếng, và kháng thể được điều chế với nồng độ cuối cùng 2X (100 nM) được pha loãng liên tục với tỷ lệ 1/10, sao cho các tế bào thu được này được thêm 100 µl vào mỗi giếng ở sáu nồng độ (cụ thể là 200 nM, 20 nM, 2 nM, 200 pM, 20 pM và 2 pM) cho mỗi kháng thể. Sau đó, đĩa được nuôi cấy trong 5 ngày ở điều kiện 37°C, độ ẩm 95% và 5% (v/v) CO₂, sau đó các tế bào thu được này được cố định bằng dung dịch 10% TCA (Tricloaxetic; Sigma, #T0699) vào ngày cuối cùng. Các tế bào cố định thu được này được nhuộm trong 25 phút theo cách 80 µl dung dịch 0,4% SRB (sulforhodamin B) được thêm vào từng giếng, sau đó các tế bào thu được này được rửa 5 lần bằng dung dịch axit axetic 1%. Sau đó, 150 µl dung dịch Tris 10 mM được đưa vào từng giếng của một đĩa khô để hòa tan thuốc nhuộm SRB, sau đó mật độ quang được đo ở bước sóng 540 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa vi thể.

Ngoài ra, các dòng tế bào MKN45 (#JCRB0254) đã được pha loãng trong môi trường RPMI-1640 (Gibco, #A10491) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia với mật độ $2,5 \times 10^3$ vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, tiếp đó đĩa được nuôi qua đêm trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó, môi trường của mỗi giếng của đĩa được thay thế bằng 100 µl môi trường RPMI-1640 chứa 1% (v/v) FBS, sau đó kháng thể thử nghiệm được pha loãng tuần tự với tỷ lệ 1/10 (cụ thể là 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM và 1 pM) để đạt 1 pM ở nồng độ cuối cùng từ 100 nM, tiếp đó kháng thể thu được này được thêm 100 µl vào mỗi giếng. Sau đó, đĩa được nuôi cấy trong 5 ngày trong điều kiện 37°C, 5% CO₂, sau đó môi trường được loại bỏ, dung dịch

TCA được thêm 200 μ l vào mỗi giếng để cố định tế bào. Như được trình bày trong thử nghiệm trên tế bào U87 MG, các tế bào của đĩa được nhuộm theo phương pháp xét nghiệm so màu SRB thông thường, sau đó mật độ quang học của mỗi giếng được đo ở bước sóng 540 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa vi thể. Kết quả của các dòng tế bào U87 MG và MKN45 được trình bày trên Bảng 3 và Fig.1.

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm *in vitro* đối với hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể C-met lai

	U-87 MG (Chất tự tiết GBM, HGF) IC ₅₀ (nM)	MKN45 (ung thư dạ dày, c-Met được khuếch đại) IC ₅₀ (nM)
LY2875358 (Eli Lilly)	> 100	0,34
0A-5D5 (Genentech)	> 100	> 100
8C4 lai	17,5	9,78
5G3 lai	> 100	0,32
IgG1 khảm 8C4	32,4	> 100
IgG2 khảm 8C4	> 100	12,92
IgG2 khảm 5G3	> 100	0,41

Như trình bày trên Bảng 3 và Fig.1 trên đây, các kháng thể kháng c-Met 8C4, 5G3 và kháng thể khảm của chúng theo sáng chế đều có hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u, tương đương hoặc tốt hơn các kháng thể c-Met đã biết LY2875353 và OA-5D5 (nhóm đối chứng). Do đó, các kháng thể 8C4, 5G3 và dạng đột biến của chúng như kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể được tối ưu hóa ái lực với kháng nguyên của sáng chế có thể được sử dụng rất có giá trị trong phòng hoặc điều trị ung thư liên quan đến c-Met.

Trình tự điều hòa cụ thể cho vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể 8C4, 5G3 của sáng chế được trình bày trên Bảng 4 sau đây.

Bảng 4. SEQ ID NO điều hòa cho vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể 8C4, 5G3

	Trình tự axit amin điều hòa		Trình tự nucleotit điều hòa	
	chuỗi nhẹ	chuỗi nặng	chuỗi nhẹ	chuỗi nặng

8C4	DILMTQSPA SLSASVGE TVTITCGA SENIYGALN WYQRKQG KSPQLLIYG ATNLADGM SSRFSGSGSG RQFSLKITS LHPDDVAT YYCQNVLS SPYTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 13)	EVQLQQSG AELARPGAS VKLSCKAS GYTFSDYYI NWVKQGTG QGLEWIGEI FPGSGNTHF SARFKGKA TLTADKSSS TAYMQLSS LTSTDSAVY FCAGGDY G FLYWGR GTLYTVSA (SEQ ID NO: 15)	gatattctga tgaccagtc tccagcttca ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc atcacatgtg gagcaagtga gaatatttac ggtgctttaa attggtatca gcgaaaacag ggaaaatctc ctcagctcct gatctatggt gcaaccaact tggcagatgg catgtcatcg aggttcagtg gcagtgggtc tggtagacag ttttctctca agatcactag cctgcatcct gacgatgttg caacgtatta ctgtcaaaat gtgctaagta gtccgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaatcaa a (SEQ ID NO: 17)	gaggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggg ccggggcttc agtgaagctg tctgcaagg cttctggcta caccttcagt gactactata taaactgggt gaagcagggg actggacagg gccttgagtg gattggagag atttttctg gaagtggaaa tactcacttc agtgcgaggt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac atgcagctca gcagcctgac atctacggac tctgcagtct atttctgtgc cgggggtgac tacgggttct tttactgggg ccgagggact ctggtcactg tctctgca (SEQ ID NO: 19)
5G3	QIVLTQSPA IMSASPGE KVTMTCS AISSVRYMY WYQQKPGS SPRLLIYDTS NLASGVPGR FSGSGSGT SNSLTISRL EAEDMTY Y CQQWSSYP RTFGGGTK	3GQLQQSGA ELARPGAS VKMSCKAS GYTFTDYTL HWVKQRPG QGLEWIGYI MPYSGYTK YNQKFKDK A ILTADKSSS TAYMQLSG LTSEDSAVF YCARGHMD	caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccacctc aagtgtacgt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctggctgc ttcagcggca gtgggtctgg gaccttaac tctctcacia tcagccgatt ggaggetgaa gatgctgcca	cagggccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg tctgcaagg cttctggcta cacctttact gactacacgc tgcactgggt aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaactctt acagtggta tactaattac aatcagaaat tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac

LEIK (SEQ ID NO: 14)	YWGQGTS VIVSS (SEQ ID NO: 16)	cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cacggacgtt cggtggaggc accaagctgg aaatcaaa (SEQ ID NO: 18)	atgcaactga gcggcctgac atctgaagac tctgcagtct tttattgtgc aagaggacat atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca (SEQ ID NO: 20)
----------------------	-------------------------------------	---	---

Ví dụ 2. Sản xuất kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể 8C4 và xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u in vitro của chúng

Kháng thể 8C4 chuột đã được làm tương thích với người và hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong ống nghiệm đã được xác định, để xác định thêm tác dụng của kháng thể được sản xuất theo sáng chế.

Đối với thiết kế tương thích với người của chuỗi nặng kháng thể 8C4, một gen dòng sinh dục người có tính tương đồng cao với gen trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 8C4 chuột đã được phân tích thông qua Ig Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Kết quả đã xác định được rằng IGHV3-23 có 48% tương đồng với kháng thể 8C4 ở mức axit amin, và cũng xác định được rằng IGHV3-11 có 46% tương đồng với kháng thể 8C4 ở mức axit amin.

CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của kháng thể 8C4 chuột được xác định bằng cách đánh số Kabat, và hu8C4-1 được tạo ra theo cách phần CDR của kháng thể 8C4 chuột được đưa vào khung của IGHV3-23. Đồng thời, các axit amin số 48 (V → I), số 49 (S → G), số 71 (R → A), số 73 (N → K), số 78 (L → A) và số 94 (K → G) được đột biến đảo ngược thành trình tự axit amin ban đầu của kháng thể 8C4 chuột để cuối cùng tạo ra một chuỗi nặng hu8C4-1. Trong trường hợp hu8C4-2, phần CDR của kháng thể 8C4 chuột được biểu hiện bằng cách đưa vào khung của IGHV3-11, và các trình tự axit amin số 48 (V → I), số 49 (S → G), số 71 (R → A), số 73 (N → K), số 78 (L → A) và số 94 (R → G) được đột biến đảo ngược thành trình tự axit amin ban đầu của kháng thể 8C4 chuột để cuối cùng tạo ra một chuỗi nặng hu8C4-2.

Ngay cả trong trường hợp chuỗi nhẹ của kháng thể 8C4, đối với thiết kế tương thích với người, gen dòng sinh dục người có độ tương đồng cao với gen trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8C4 chuột đã được phân tích thông qua Ig Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Kết quả đã xác định được rằng IGKV1-27 có

65,3% tương đồng với kháng thể 8C4 ở mức axit amin, và cũng xác định được rằng IGKV1-33 có 64,2% tương đồng với kháng thể 8C4 ở mức axit amin.

CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của kháng thể 8C4 chuột được xác định bằng cách đánh số Kabat và phần CRD của kháng thể 8C4 chuột được thể hiện bằng cách đưa vào khung IGKV1-33 và khung IGKV1-27, do đó tạo ra hu8C4-1 và hu8C4-2 tương ứng. Đồng thời, axit amin số 69 ($T \rightarrow R$) của cả hu8C4-1 và hu8C4-2 đã được đột biến đảo ngược thành trình tự axit amin ban đầu của kháng thể 8C4 chuột.

Kháng thể được làm tương thích với người 8C4 được biểu hiện trong tế bào 293T bằng cách sử dụng vector pCLS05 (Đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-1420274). Liên quan đến các kháng thể được làm tương thích với người thu được ở dạng IgG1, việc có hay không có hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong U-87 MG, dòng tế bào u nguyên bào đệm ở người, đã được xác định bằng phương pháp tương tự như được trình bày trong Ví dụ 1 ở trên.

Kết quả, có thể xác định được rằng giá trị IC_{50} của hu8C4-1 và hu8C4-2 tương ứng là 30 nM và 24,6 nM, do đó cho thấy mức độ hoạt tính chống ung thư tương tự như của kháng thể khảm 8C4 ($IC_{50} = 32,4$ nM).

Trình tự điều hòa cụ thể cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể được làm tương thích với người hu8C4-1 và hu8C4-2 được trình bày trên bảng 5.

Bảng 5. SEQ ID NO điều hòa cho vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể hu8C4-1 và hu8C4-2 được làm tương thích với người

	Trình tự axit amin điều hòa		Trình tự nucleotit điều hòa	
	chuỗi nhẹ	chuỗi nặng	chuỗi nhẹ	chuỗi nặng
hu8C4-1	DIQMTQS PSSLSASV GDRVTI TCGASENIY GALNWF QQKPGKAP	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC AASGYTFS DYYINW VRQAPGKG	gatatccagatgacc cagtctcccagcagt ctttccgcttctgtg ggtgatagggtgacg ataacttcggagca agtgagaatatttac	gaggttcagttagt gaat ccggaggagga ctggtgcagcctggt ggaagtttgaggctg tcatgcgcagccagt ggctacaccttcagt

	KLLIYGAT NLADGVPS RFSGSGS GRDPTFTI SSLQPED IATYYCQN VLSSPYT FGQGTKVE IK (SEQ ID NO: 21)	LEWIGEIF PGSGNTH FSARFKGR ATLSADKS KNTAYLQ MNSLRAED TAWYCA GGDYGFY WGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 23)	ggtgctttaattgg taccagcagaagcct gggaaagctccaaag ctgctgatctatggt gcaaccaacttgga gatggcgccctagc aggttcagcggcagc ggaagcggcagagac ttactttcacaatc tctccctgcaacc gaggacattgcaacc tactattgtcaaat gtgctaagtagtccg tacacgtttggccag ggaaccaaggttgaa attaaa (SEQ ID NO: 25)	gactactatataaac tgggtaagacaggct cccggaaaagggtg gagggttgaggag atttttctggaagt ggaaatactcacttc agtgcgaggttcaag ggccgagccaccctc tcagcagacaaaagc aagaataccgcctat ctgcagatgaatagc cttcgcgagaagat actgccgtgtattac tgtgccgggggtgac tacgggtttctttac tggggacagggcacc ttggtgacagtctcttct (SEQ ID NO: 27)
hu8C4-2	DIQMTQS PSSLSASV GDRV1TC GASENIY GALNWWYQ QKPGKVPK LLIYGAT NLADGVPS RFSGSGS GRDFTLTI SSLQPEDV ATYYCQN VLSSPYTF	QVQLVESG GGLVKPG GSLRLSCA ASGYTFS DYYINWIR QAPGKGL EWIGEIFP GSGNTHF SARFKGR ATISADKA KNSAYLQ MNSLRAED TAVYYCA	gacatccagatgacc cagietccatctcc ctgtctgcatctgta ggagacagagtcacc atcacttgaggagca agtgagaatatttac ggtgctttaattgg taccagcagaaacca gggaaagttcctaag ctctgatctatggt gcaaccaacttgga gatgggtcccatct cgggtcagtggcagc	cagggtcagttagt gaatccggaggagga ctggtgaagcctggt ggaagttgaggctg tcatgagcagccagt ggctacaccttcagt gactactatataaac tggatcagacaggct cccggaaaagggtg gagggttgaggag atttttctggaagt ggaaatactcacttc agtgcgaggttcaag

	QGTKVE IK (SEQ ID NO: 22)	GGDYGFLY WGQGT L VTVSS (SEQ ID NO: 24)	ggatctgggcgagat ttactctcaccatc agcagcctgcagcct gaagatgttgcaact tattactgtcaaaat gtgctaagtagtccg tacacgttgccag ggaaccaagggtgaa attaaa (SEQ ID NO: 26)	ggccgagccaccatc tcagcagacaaagcg aagaatagcgctat ctgcagatgaatagc cttcgcgcagaagat actgccgtgtattac tgtgccgggggtgac tacgggtttctttac tggggacagggcacc ttggtgacagtctct tct (SEQ ID NO: 28)
--	---------------------------------	--	--	--

Ví dụ 3. Sản xuất kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể 5G3 và xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u in vitro của nó

Sau đó, kháng thể 5G3 của chuột theo sáng chế đã được làm tương thích với người để xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong ống nghiệm.

Cụ thể là, đối với thiết kế chuỗi nặng hu5G3-1, gen dòng sinh dục người có độ tương đồng cao nhất với gen trong vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G3 của chuột đã được phân tích thông qua Ig Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Kết quả đã xác định được rằng IGHV1-46 có 67,3% tương đồng với kháng thể 5G3 ở mức axit amin. CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của kháng thể 5G3 chuột được xác định bằng cách đánh số Kabat, và phần CRD của kháng thể 5G3 chuột được thể hiện bằng cách đưa vào khung của IGHV1-46. Đồng thời, các axit amin số 48 (M → I), số 69 (M → L), số 71 (R → A), số 73 (T → K) và số 78 (V → A) được đột biến đảo ngược thành trình tự axit amin ban đầu của kháng thể 5G3 chuột. Bằng cách đó, một chuỗi nặng hu5G3-1 đã được xây dựng.

Đối với chuỗi nhẹ hu5G3-1, CDR ghép đã được thực hiện trong gen IGKV3-20 có 63,5% tương đồng với kháng thể 5G3, và axit amin số 43 (A → S), số 60 (D → A) và số 71 (F → N) đã được đột biến đảo ngược để cấu thành chuỗi nhẹ hu5G3-1.

Ngoài ra, để thiết kế chuỗi nặng hu5G3-2, CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của kháng thể 5G3 chuột được xác định bằng cách đánh số Kabat được đưa vào bằng cách

sử dụng phân nhóm VH3, vốn được biết đến là phân nhóm ổn định nhất. Đồng thời, axit amin số 67 (F → A), số 69 (I → L), số 73 (T → K), số 90 (Y → F) và số 94 (T → R) được đột biến đảo ngược thành chuỗi axit amin ban đầu của kháng thể 5G3 chuột. Bằng cách này, chuỗi nặng hu5G3-2 đã được xây dựng.

Đối với chuỗi nhẹ hu5G3-2, CDR ghép đã được thực hiện trong gen IGVK, vốn tạo thành cấu trúc ổn định với phân nhóm VH3, và đột biến đảo ngược không được thực hiện.

Kháng thể được làm tương thích với người 5G3 được biểu hiện trong tế bào 293T bằng cách sử dụng vector pCLS05 (đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-1420274). Liên quan đến các kháng thể được làm tương thích với người hóa thu được ở dạng IgG2, việc có hay không có hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong MKN45, dòng tế bào ung thư dạ dày ở người, đã được xác định bằng phương pháp tương tự như được trình bày trong Ví dụ 1 ở trên.

Kết quả, có thể xác định được rằng the giá trị IC_{50} của hu5G3-1 và hu5G3-2 tương ứng là 0,52 nM và 0,5 nM, do đó cho thấy mức độ hoạt tính chống ung thư tương tự như của kháng thể 5G3 khảm ($IC_{50} = 0,41$ nM).

Trình tự điều hòa cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu5G3-1 và hu5G3-2 được trình bày trên Bảng 6.

Bảng 6. SEQ ID NO điều hòa cho vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể hu5G3-1 và hu5G3-2 được làm tương thích với người

	Trình tự axit amin điều hòa		Trình tự nucleotit điều hòa	
	chuỗi nhẹ	chuỗi nặng	chuỗi nhẹ	chuỗi nặng
hu5G3-1	EIVLTQSP	QVQLVQSG	gaaattgtgt tgacacagtc	caggtgcagc tgggtgcagtc
	ATLSLSPG	AEVKKPGA	tccagccacc ctgtctttgt	tggggctgag gtgaagaagc
	ERATLSCS	SVKVSCKA	ctccagggga aagagccacc	ctggggcctc agtgaaggtt
	ATSSVRYM	SGYTFTDY	ctctcctgca gtgccacctc	tcctgcaagg catctggata
	YWYQQKP	TLHWVRQA	aagtgtacgt tacatgtact	caccttcacc gactacacgc
	GQSPRLLIY	PGQGLEWI	ggtaccagca gaaacctggc	tgcactgggt gcgacaggcc
	DTSNLASGI	GYINPYSG	cagtctccca ggctcctcat	cctggacaag ggcttgagtg

	PARFSGS GSGTDNTL TISRLEPE DFAVYYC QQWSSYPRT FGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 29)	YTNYNQKF KDRVTLTA DKSTSTAY MELSSLRS EDTAVYYC ARGHMDYW GQGTLVTV (SEQ ID NO: 31)	ctatgacaca tccaacctgg cttctggcat cccagcaagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacaac actctacca tcagcagact ggagcctgaa gattttgcag ttattactg tcagcagtgg agtagttacc cacggacgtt cggcggaggg accaaggtgg agatcaaa (SEQ ID NO: 33)	gataggatac attaactctt acagtgggta tactaattac aatcagaaat tcaaggacag agtcacctg accgcagaca aatccacgag cacagcctac atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc tagaggacat atggactact ggggccaagg aacctggtc accgtctcct ca (SEQ ID NO: 35)
hu5 G3-2	DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCSA TSSVRYM YWYQQKPG KAPKLLIY DTSNLASG VPSRFSGS GSGTDFTL TISSLQPE DFATYYC QQWSSYPRT FGQGTK VEIK (SEQ ID NO: 30)	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAAS GYTFTDY TLHWVRQA PGKGLEWV GYINPYSGY TNYNQKF KDRATLSA DKSKNTAY LQMNSLRA EDTAVFYC ARGHMDYW GQGTLVTV (SEQ ID NO: 32)	gacatccaga tgactcagag tcctcttct ctgtctgcct cagtgggaga tcgggtcaca atcacatgtt cagcaacaag ctcatgcca tacatgtatt ggtaccagca gaagccaggc aaagcccaa agctgctgat ctatgacaca tctaacttgg ccagcggcgt cccatctcgc ttctcaggct ccggaagcgg tactgatttt accctgacta ttcttcctt gcagcctgag gacttcgcaa cctattattg ccagcagtgg tctagctacc ctgcacatt cggccaggga accaaggtcg aaattaa (SEQ ID NO: 34)	gaagtccaac ttgtggagtc aggaggcggg ctctgcagc caggcggatc attgcgactt tcttgtctg cctcagggtg caccttact gattatacct tgcattgggt tcgccaagca cccgtaagg gtctcgaatg ggtaggatac attaatccat acagcggcta caccaactac aaccagaaat tcaaagacag ggctaccctt agtgccgaca agtctaagaa caccgcctac ctccagatga actcccttag agccgaggat actgctgtgt ttattgcgc taggggtcat atggactact ggggacaggg gaccttggtg actgtgtctt cc (SEQ ID NO: 36)

Ví dụ 4. Tạo đột biến vùng bản lề và thử nghiệm hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của nó

Tiếp theo, thử nghiệm về hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u đã được thực hiện đối với trình tự bản lề của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 ở người.

Trước hết, vùng bản lề của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người có chuỗi axit amin “EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 37)”, được thay thế để thu được đột biến vùng bản lề có trình tự axit amin của SEQ ID NO: ID 38 đến SEQ NO: 44.

Các đột biến thu được mà được nhân dòng tương ứng thành vector bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể được làm tương thích với người hu8C4-1, hu8C4-2 được tạo ra trong Ví dụ 2 ở trên. Hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* theo trình tự bản lề được xác định trong U-87 MG bằng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 1 trên đây.

Ngoài ra, hiệu quả của kháng thể được làm tương thích với người 8C4 đã được phân tích như sau đối với dòng tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1993 (ATCC, #CRL-5909). Các dòng tế bào NCI-H1993 đã được pha loãng trong môi trường RPMI-1640 (Gibco, #A10491) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia với mật độ $3,0 \times 10^3$ vào mỗi giếng của đĩa 96, đĩa được nuôi qua đêm trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó, môi trường của mỗi giếng của đĩa được thay thế bằng 100 µl môi trường RPMI-1640 chứa 2% (v/v) FBS, sau đó kháng thể thử nghiệm được pha loãng tuần tự với tỷ lệ 1/10 (nghĩa là 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM và 1 pM) để đạt 0,001 nM ở nồng độ cuối cùng từ nồng độ 100 nM, tiếp đó kháng thể thu được này được thêm 100 µl vào mỗi giếng. Sau đó, đĩa được nuôi cấy trong 5 ngày trong điều kiện 37°C, 5% CO₂, sau đó môi trường được loại bỏ, dung dịch TCA (Sigma, #T0699) được thêm 200 µl vào mỗi giếng để cố định tế bào. Ngoài ra, các tế bào của đĩa được nhuộm theo phương pháp xét nghiệm so màu SRB thông thường, sau đó mật độ quang học của mỗi giếng được đo ở bước sóng 540 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa vi thể.

Kết quả của hu8C4-1 trong U-87 MG và NCI-H1993 (ATCC, #CRL-5909) trình bày trên Bảng 7.

Bảng 7. Trình tự đột biến vùng bản lề và kết quả của xét nghiệm *in vitro* đối với hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u

SEQ ID NO	Axit amin	SEQ ID NO	Nucleotit	U-87 MG (Chất tự tiết GBM, HGF) (IC ₅₀ nM)	NCI-H1993 (NSCLC, c-Met được khuếch đại) (IC ₅₀ nM)
37	EPKSCDK THTCPPCP	45	gagcccaaattctgtgacaaaactc acacatgcc caccgtgccca	12,6	> 100
38	ERKCCV ECPPCP	46	gagcgaaaatgttgtgtcgag tgcccaccgtgcc ca	31,0	0,30
39	ECCVEC PPCP	47	gagtgttgtgtcgagt gcccaccgtgccca	57,3	> 100
40	ERKCCC PPCP	48	gagcgaaaatgttgtt gcccaccgtgccca	37,6	0,23
41	ECCCPPCP	49	gagtgttgtgcc caccgtgccca	25,3	> 100
42	EKCCVE CPPCP	50	gagaaatgttgtgtcg agtgccaccgtgccca	31,4	0,48
43	ERKCCV CPPCP	51	gagcgaaaatgttgt gtctgccaccgtgccca	30,8	0,47
44	EKCCVC PPCP	52	gagaaatgttgtgtc tgcccaccgtgccca	75,9	0,38

Như đã trình bày trên Bảng 7, có một số khác biệt trong hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể hu8C4 theo sự khác biệt của trình tự bản lề, nhưng có thể xác định được rằng kháng thể này có hiệu quả ức chế sự tăng sinh của hầu hết các tế bào khối u. Theo đó, sau đây, kháng thể được làm tương thích với người IgG1 có vùng bản lề SEQ ID NO: 38 trong hu8C4-1 được gọi là hu8C4, và kháng thể được tối ưu hóa ái lực đã được tạo ra để xác định hiệu quả của chúng.

Ví dụ 5. Sản xuất kháng thể được tối ưu hóa ái lực hu8C4 và xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong ống nghiệm

Để tạo ra kháng thể được tối ưu hóa ái lực hu8C4, thư viện scFv được hiện thị trên thể thực khuẩn trước tiên được tạo ra bằng cách sử dụng vector phagemit được biểu hiện dưới dạng kết hợp của scFv và pIII, trong đó cấu trúc giản lược của vector được minh họa trên Fig.2. Vector phagemid bao gồm mảnh scFv của một kháng thể dưới sự kiểm soát của lac cảm ứng IPTG, trong đó trình tự liên kết được sử dụng là GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ. NO 53).

Tiếp đó, oligonucleotit gây đột biến có bộ ba mã hóa NNK đã được sử dụng để đưa vào miền CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của hu8C4. Theo đó, thư viện scFv hu8C4 với sự hợp nhất của His, HA và pIII đã được tạo ra, sau đó một kháng thể đặc hiệu c-Met của người được chọn từ thư viện kháng thể đã tạo ra.

Cụ thể là, một phương pháp chọn lọc cạnh tranh đã được sử dụng để chọn kháng thể có ái lực được cải thiện. Kháng nguyên c-Met ở người được gắn theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong Dynabeads® M-280 (Thermo Fisher Scientific, 11205D). Hạt với kháng nguyên gắn vào đó bị phong tỏa trong 2 giờ bởi muối đệm Tris siêu phong tỏa (TBS, Pierce). Thể thực khuẩn tái tổ hợp sinh trưởng qua đêm ở 37°C, rồi tiếp đó thể thực khuẩn tái tổ hợp được ly tâm và thể thực khuẩn ở phần dịch nổi được phong tỏa bằng TBS siêu phong tỏa, 0,05% Tween 20 trong 2 giờ. Tiếp đó, hạt được rửa bằng PBS bao gồm 0,05% Tween 20. Dung dịch thể thực khuẩn được phong tỏa được bổ sung vào hạt đã rửa, sau đó hạt thu được này được ủ trong thiết bị quay trong 2 giờ để thể thực khuẩn gắn, tiếp đó hạt thu được này được rửa bằng PBS chứa 0,05% Tween 20. Tiếp đó, kháng nguyên c-Met người được bổ sung vào 1 ml PBS chứa 0,05% Tween 20, sau đó kháng nguyên thu được này được ủ trong thiết bị quay trong 24 giờ (Rouet R và cộng sự (2012) *Nat Protoc* . 7:364-373). Sau đó, thể thực khuẩn gắn vào hạt được rửa giải bằng 100 mM trietanolamin trong 5 phút, sau đó sản phẩm rửa giải được trung hòa bằng 0,5 M tris/Cl (pH 7,2). Dung dịch trung hòa thể thực khuẩn rửa giải được gây nhiễm bằng *E. coli* TG1.

Dòng riêng lẻ được chọn lọc thông qua thí nghiệm đã phát triển ở dạng 96 giếng của 200 µl môi trường lỏng 2xYT được bổ sung carbenixilin và ampicilin, sau đó dịch nổi nuôi cấy của nó được sử dụng trực tiếp để phân tích ELISA để chọn lọc scFv được biểu hiện trên thể thực khuẩn gắn với đĩa được phủ protein đích. Trình tự axit amin của vùng CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được phát hiện được trình bày trên

Bảng 8 và Bảng 9, trình tự axit amin đại diện của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tối ưu hóa ái lực được trình bày trên Bảng 10.

Bảng 8. Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AH01	DYYIN	7	EIDPGSGNTHFSARFKG	54	GDYGFLY	9
AH02	DYYIN	7	EIEPGSGNIHFSARFKG	55	GDYGFLY	9
AH03	DYYIN	7	EIWPGSGNTHFSARFKG	56	GDYGFLY	9
AH04	DYYIN	7	EIYPGSGNTHFSARFKG	57	GDYGFLY	9
AH05	DYYIN	7	EIFPGWGNTTHFSARFKG	58	GDYGFLY	9
AH06	DYYIN	7	EIFPGY GNTHFSARFKG	59	GDYGFLY	9
AH07	DYYIN	7	EIFPGSGYTHFSARFKG	60	GDYGFLY	9
AH08	DYYIN	7	EIFPGSGNTWFSARFKG	61	GDYGFLY	9
AH09	DYYIN	7	EIFPGSGNTYFSARFKG	62	GDYGFLY	9
AH12	DYYIN	7	EIFPGWGNTYFSARFKG	63	GDYGFLY	9
AH13	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	QDYGFLY	64
AH14	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	EDYGFLY	65
AH15	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	HDYGPLY	66
AH16	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	NDYGFLY	67
AH17	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	VELGFLY	68
AH18	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	FETGYYL	69
AH19	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GEYGYQN	70
AH20	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	WEYGLSM	71
AH21	DYYIN	7	EIFPHFTSDHFSARFKG	72	GDYGFLY	9
AH22	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSAWMGT	73	GDYGFLY	9

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AH23	DYYIN	7	EIFPGSGNESVSFRFKG	74	GDYGFLY	9
AH24	DYYIN	7	EIFPGSGNSAYISRFGK	75	GDYGFLY	9
AH25	DYYIN	7	EIFPGSGNHTWRRFKG	76	GDYGFLY	9
AH26	DYYIN	7	EIFPGSGNLSMHGRFKG	77	GDYGFLY	9
AH27	DYYIN	7	EIFPGSGNIITPVFRFKG	78	GDYGFLY	9
AH28	DYYIN	7	EIFPGSGNPFLTIRFKG	79	GDYGFLY	9
AH29	DYYIN	7	EIFPGSGNSHW SRFKG	80	GDYGFLY	9
AH30	DYYIN	7	EIFPGSGNLSGIRSFKG	81	GDYGFLY	9
AH31	DYYIN	7	EIFPGSGNFFHGKRFGK	82	GDYGFLY	9
AH32	DYYIN	7	EIFPGSGNPRLGARFKG	83	GDYGFLY	9
AH33	DYYIN	7	EIFPGSGN V SQ VERFKG	84	GDYGFLY	9
AH34	DYYIN	7	EIFPGSGNFHGASRFKG	85	GDYGFLY	9
AH35	DYYIN	7	EIFPGSGNVVGGYRFKG	86	GDYGFLY	9
AH36	DYYIN	7	EIFPGSGNPMYDERFKG	87	GDYGFLY	9
AH37	DYYIN	7	EIFPGSGNADLTIRFKG	88	GDYGFLY	9
AH38	DYYIN	7	EIFPGSGNSTNLYRFKG	89	GDYGFLY	9
AH39	DYYIN	7	EIFPGSGNLDIPPRFKG	90	GDYGFLY	9
AH40	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSSAPLP	91	GDYGFLY	9
AH41	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSSEFVS	92	GDYGFLY	9
AH42	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSMSESF	93	GDYGFLY	9
AH43	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSDGSRN	94	GDYGFLY	9
AH44	DYYIN	7	E T FPGSGNTHFSSSVSR	95	GDYGFLY	9
AH45	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSRSVSG	96	GDYGFLY	9

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AH46	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSGLSEV	97	GDYGFLY	9
AH47	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSHYfAS	98	GDYGFLY	9
AH48	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSTGLTQ	99	GDYGFLY	9
AH49	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSRHLH	100	GDYGFLY	9
AH50	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSVPRSM	101	GDYGFLY	9
AH51	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSLQDYL	102	GDYGFLY	9
AH52	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSDGVSS	103	GDYGFLY	9
AH53	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSMGGSE	104	GDYGFLY	9
AH54	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSGNVHW	105	GDYGFLY	9
AH55	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSRSPTP	106	GDYGFLY	9
AH56	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSLR1PP	107	GDYGFLY	9
AH57	DYYAN	108	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLY	9
AH58	GYVIN	109	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLY	9
AH59	QYYIN	110	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLY	9
AH60	DQYIN	111	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLY	9
AH61	DYYQN	112	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLY	9
AH62	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDVGFLY	113
AH63	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFQY	114
AH64	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDYGFLQ	115
AH65	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	GDQWLLC	116
AH66	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSARFKG	8	WDYGFLY	117
AH67	DYYIN	7	EIFPDSAPSHFSARFKG	118	GDYGFLY	9
AH68	DYYIN	7	EIFPYFLPPHFSARFKG	119	GDYGFLY	9

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AH69	DYYIN	7	EIFPGPFTPHFSARFKG	120	GDYGFLY	9
AH70	DYYIN	7	EIFPGSNFGHFSARFKG	121	GDYGFLY	9
AH71	DYYIN	7	EIFPGWGNTHFSARFKG	58	QDYGFLY	64
AH72	DYYIN	7	EIFPGWGNTHFSRSPTP	122	GDYGFLY	9
AH73	DYYIN	7	EIFPGWGNSHWSRFGK	123	GDYGFLY	9
AH74	DYYIN	7	EIFPGYGNTTHFSARFKG	59	QDYGFLY	64
AH75	DYYIN	7	E1FPGY GNTY FSARFKG	124	GDYGFLY	9
AH76	DYYIN	7	EIFPGYGNTTHFSRSPTP	125	GDYGFLY	9
AH77	DYYIN	7	EIFPGYGNSHWSRFGK	126	GDYGFLY	9
AH78	DYYIN	7	EIFPGSGNTYFSARFKG	82	QDYGFLY	64
AH79	DYYIN	7	EIFPGSGNTYFSRSPTP	127	GDYGFLY	9
AH80	DYYIN	7	EIFPGSGNSHWSRFGK	80	QDYGFLY	64
AH81	DYYIN	7	EIFPGSGNSHWSRPTP	128	GDYGFLY	9
AH82	DYYIN	7	EIFPGSGNSHWSRPTP	128	GDYGFLY	9
AH83	DYYIN	7	EIFPGWGNTYFSARFKG	53	QDYGFLY	64
AH84	DYYIN	7	EIFPGWGNTHFSRSPTP	122	QDYGFLY	64
AH85	DYYIN	7	EIFPGWGNSHWSRFGK	123	QDYGFLY	64
AH86	DYYIN	7	EIFPGYGNTYFSARFKG	124	QDYGFLY	64
AH87	DYYIN	7	EIFPGYGNSHWSRFGK	126	QDYGFLY	64
AH88	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSRSPTP	106	QDYGFLY	64
AH89	DYYIN	7	EIFPGYGNTTHFSRSPTP	125	QDYGFLY	64
AH90	DYYIN	7	EIFPGSGNTYFSRSPTP	127	QDYGFLY	64
AH91	DYYIN	7	EIFPGSGNSHWSRPTP	128	QDYGFLY	64

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AH92	DYYIN	7	EIFPGSGNSHWSSPTP	129	QDYGFLY	64
AH93	DYYIN	7	EIFPDSAPSYFSARFKG	130	GDYGFLY	9
AH94	DYYIN	7	EIFPGPFTPYFSARFKG	131	GDYGFLY	9
AH95	DYYIN	7	EIFPGSNFGYFSRSPTP	132	GDYGFLY	9
AH96	DYYIN	7	EIFPDSAPSHWSRFGK	133	GDYGFLY	9
AH97	DYYIN	7	EIFPGPFTSHWSRFGK	134	GDYGFLY	9
AH98	DYYIN	7	EIFPGSNFHSWSRFGK	135	GDYGFLY	9
AH99	DYYIN	7	EIFPDSAPSHFSRSPTP	136	GDYGFLY	9
AH100	DYYIN	7	EIFPGPFTPHFSRSPTP	137	GDYGFLY	9
AH101	DYYIN	7	EIFPGSNFGHFSRSPTP	138	GDYGFLY	9
AH102	DYYIN	7	EIFPDSAPSH WSSPTP	139	GDYGFLY	9
AH103	DYYIN	7	EIFPGPFTSHVVSSPTP	140	GDYGFLY	9
AH 104	DYYIN	7	EIFPGSNFHSWSSPTP	141	GDYGFLY	9
AH 105	QYYIN	110	EIFPDSAPSHFSARFKG	118	GDYGFLY	9
AH 106	QYYIN	110	EIFPGPFTPHFSARFKG	120	GDYGFLY	9
AH107	QYYIN	110	EIFPGSNFGHFSARFRG	121	GDYGFLY	9
AH 108	DYYIN	7	EIFPDSAPSHFSARFKG	118	QDYGFLY	64
AH109	DYYIN	7	EIFPGPFTPIIFSARFKG	120	QDYGFLY	64
AH 110	DYYIN	7	EIFPGSNFGHFSARFRG	121	QDYGFLY	64
AH111	DYYIN	7	EIFPDSAPSHFSARFKG	118	GDYGFQY	114
AH112	DYYIN	7	EIFPGPFTPHFSARFKG	120	GDYGFQY	114
AH 113	DYYIN	7	EIFPGSNFGHFSARFRG	121	GDYGFQY	114
AH114	DYYIN	7	EIFPDSAPSHFSARFKG	118	GDYGFLQ	115

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nặng					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AH115	DYYIN	7	EIFPGPFTPHFSARFKG	120	GDYGFLQ	115
AH116	DYYIN	7	EIFPGSNFGHFSARFKG	121	GDYGFLQ	115
AH117	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSMSESF	93	HDYGFLY	66
AH118	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSLQDYL	102	HDYGFLY	66
AH119	DYYIN	7	EIFPGSGNTHFSMQGSE	104	HDYGFLY	66

Bảng 9

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL01	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVWSSPYT	142
AL02	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLNSPYT	143
AL03	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLESPYT	144
AL04	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLKSPYT	145
AL05	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLYSPYT	146
AL06	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSRPYT	147
AL07	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSSEPET	148
AL08	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSEPYT	149
AL11	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLESPET	150
AL12	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSVPET	151
AL13	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSLPET	152
AL14	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSIPET	153
AL15	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSMPET	154
AL16	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILSSPET	155

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL17	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLISSPET	156
AL18	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNMISSPET	157
AL19	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNIISLPET	158
AL20	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNIISIPET	159
AL21	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNSLSSPET	160
AL22	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNTLSSPET	161
AL23	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVSSSPET	162
AL24	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVISSPET	163
AL25	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVFSSPET	164
AL26	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNWSSPET	165
AL27	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVRSSPET	166
AL28	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLVSSPET	167
AL29	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLISSPET	156
AL30	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLMSSEPET	168
AL31	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNIMSSPET	169
AL32	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVHSSPET	170
AL33	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVMSSEPET	171
AL34	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLSSPET	172
AL35	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QSVLFSPFS	173
AL36	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QQVLFFPET	174
AL37	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLSPSFY	175
AL38	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QSYLFSPFT	176
AL39	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILSSPLF	177

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL40	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNTLHYSLV	178
AL41	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QQVLFFPLL	179
AL42	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QQVLDFVFY	180
AL43	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNWSSPET	181
AL44	GASENIYGALN	1	DATNLAD	182	QNVLSSPYT	3
AL45	GASENIYGALN	1	FATNLAD	183	QNVLSSPYT	3
AL46	GASENIYGALN	1	HATNLAD	184	QNVLSSPYT	3
AL47	GASENIYGALN	1	KATNLAD	185	QNVLSSPYT	3
AL48	GASENIYGALN	1	PATNLAD	186	QNVLSSPYT	3
AL49	GASENIYGALN	1	QATNLAD	187	QNVLSSPYT	3
AL50	GASENIYGALN	1	SATNLAD	188	QNVLSSPYT	3
AL51	GASENIYGALN	1	VATNLAD	189	QNVL5SPYT	3
AL52	GASENIYGALN	1	YATNLAD	190	QNVLSSPYT	3
AL53	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	ITVLSPPYT	191
AL54	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNNLVPPFN	192
AL55	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QHVLFLLPYV	193
AL56	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QAVLTNAYT	194
AL57	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLRVGYL	195
AL58	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QSVLRVGYL	196
AL59	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNISSPYT	197
AL60	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QQVLCESFL	198
AL61	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSQSLL	199
AL62	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLQPSYL	200

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL63	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLFQPLS	201
AL64	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLFQPLV	202
AL65	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNQLDPSLF	203
AL66	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	MDVLESPYT	204
AL67	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QALLSPYT	20b
AL68	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QQLLESPYT	206
AL69	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	NLTLVSPYT	207
AL70	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	GNILDSPYT	208
AL71	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	EQVLLSPYT	209
AL72	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	NNLLDSPYT	210
AL73	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	EEVLSSPYT	211
AL74	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILFVDYT	212
AL75	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLHLNYT	213
AL76	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLQTPYT	214
AL77	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILHPGYT	215
AL78	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLTRGYT	216
AL79	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	ENILYSPYT	217
AL80	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLGGGQG	218
AL81	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLEHPLI	219
AL82	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLD D PFD	220
AL83	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLD F PLL	221
AL84	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLYPSLV	222
AL85	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLPDQQS	223

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL86	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSNEET	224
AL87	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLKHPYT	225
AL88	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSPGMW	226
AL89	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLSSPYT	3
AL90	GASENIYGALN	1	GAQNLAD	228	QNVLSSPYT	3
AL91	GSSRSIYGALN	229	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL92	RAGRSIYGALN	230	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL93	LGRRGIYGALN	231	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL94	EVQVGIYGALN	232	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL95	RPSEKIYGALN	233	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL96	RASAVTYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL97	KTGDLIYGALN	235	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL98	SCRVPITYGALN	236	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL99	VASRGIYGALN	237	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL100	RGRQNIYGALN	238	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL101	AAPRGIYGALN	239	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL102	SAPFKIYGALN	240	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL103	LGMDDIYGALN	241	GAINLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL104	NVRRGTYGALN	242	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL105	NTSGRIYGALN	243	GAINLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL106	LVSRIPIYGALN	244	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL107	WTNRPIYGALN	245	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL1G8	R1RSA1YGALN	246	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL109	GATRGIYGALN	247	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL110	EGGSPIYGALN	248	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL111	GASRGMFRALN	249	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL112	GASGLVFSALN	250	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL11,3	GASRGTHMALN	251	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL114	GASSRFHNALN	252	GAINLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL115	GASRTAFTALN	253	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL116	GASRSTFSALN	254	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL117	GASGPMFDALN	255	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL118	GASHDLYGALN	256	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL119	GASGTLFGALN	257	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL120	GASKAAFGALN	258	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL121	GASEGIVGALN	259	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL122	GASHEIHVALN	260	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL123	GASRGVFGALN	261	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL124	GASGRVRGALN	262	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL125	GASTGSFSALN	263	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL126	GASGNSFDALN	264	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL127	GASEQSYFALN	265	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL128	GASFRQFSALN	266	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL129	GASAPRHSALN	267	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL130	GASMPLFHALN	268	GATNLAD	2	QNVLSSPYT	3
AL131	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILSSPYT	269

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL132	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSMPYT	270
AL133	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLSEPET	271
AL134	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLYSPET	272
AL135	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLEEPYT	273
AL136	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLELPET	274
AL137	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLEMPET	275
AL138	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILESPET	276
AL139	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVIESPET	277
AL140	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVMESPET	278
AL141	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLESPET	279
AL142	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLYEPYT	280
AL143	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILSEPET	281
AL144	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVISEPET	282
AL145	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVMSSEPET	283
AL146	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLESPET	284
AL147	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QSVLFEPFS	285
AL148	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QSVLFEPFT	286
AL149	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILYSPET	287
AL150	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILSLPET	288
AL151	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNILSMPET	289
AL152	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLYMPET	290
AL153	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVISMPET	291
AL154	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVMSMPET	292

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL155	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLSMPET	293
AL156	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNISSPET	294
AL157	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVLYLPET	295
AL158	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVYSPET	296
AL159	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVMYSPET	297
AL160	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLYSPET	298
AL161	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVISLPET	299
AL162	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNVMSLPET	300
AL163	GASENIYGALN	1	GATNLAD	2	QNLLSLPET	301
AL164	RASAVIYGALN	234	GATGLAD	227	QNVLSSPYT	3
AL165	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLESPYT	144
AL166	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLSEPYT	149
AL167	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLSSPET	148
AL168	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLYSPYT	146
AL169	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNILSSPET	155
AL170	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNLLSSPET	172
AL171	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVISSPET	163
AL172	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVMSSPET	171
AL173	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLSLPET	152
AL174	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNVLSMPET	154
AL175	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QSVLFSPFS	173
AL176	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QNLLFQPLS	201
AL177	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QQVLFFPLL	179

	Danh mục trình tự CDR của chuỗi nhẹ					
	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AL178	GASENIYGALN	1	GATGLAD	227	QSVLFSPFT	176
AL179	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLESPYT	144
AL180	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLSEPYT	149
AL181	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLSSPET	148
AL182	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLYSPYT	146
AL183	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNILSSPET	155
AL184	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNLLSSPET	172
AL185	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVISSPET	163
AL186	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVMSSEPET	171
AL187	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLSLPET	152
AL188	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNVLSMPET	154
AL189	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QSVLFSPFS	173
AL190	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QNLLFQPLS	201
AL191	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QQVLFPPLL	179
AL192	RASAVIYGALN	234	GATNLAD	2	QSVLFSPFT	176
AL193	GASRSTFSALN	254	GATNLAD	2	QNVLSIPET	153
AL194	GASMPLFHALN	268	GATNLAD	2	QNVLSIPET	153
AL195	GASRSTFSALN	254	GATNLAD	2	QNVLEEPYT	273
AL196	GASMPLFHALN	268	GATNLAD	2	QNVLEEPYT	273

Bảng 10. Danh mục trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tối ưu hóa ái lực

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
AH71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSDYYINWVRQAPGKG	302

	LEWIGEIFPGVGNTTHFSARFKGRATLSADKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCAGQDY GFLYWGQGTL VTV SS	
AH72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSDYYINWVRQAPGKG LEWIGEIFPGWGNTHFSRSPTPRATLSADKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVY Y CAGGDY GFLYWGQGTLVTVSS	303
AH73	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSDYYINWVRQAPGKG LEWIGEIFPGWGNSHWSRFBKGRATLSADKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVY YCAGGDY GFLYWGQGTLVTVSS	304
AH85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSDYYINWVRQAPGKG LEWIGEIFPGWGNSHWSRFBKGRATLSADKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCAGQDY GFLYWGQGTLVTVSS	305
AL130	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASMPFLHALNWKYQKPGKAPK LLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGRDFTFTISLQPEDATYYCQNV SS PYTFGQGTKVEIK	306
AL135	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWKYQKPGKAPK LLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGRDFTFTISLQPEDATYYCQNV EE PYTFGQGTKVEIK	307
AL165	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWKYQKPGKAPK LLIYGATGLADGVPSRFSGSGSGRDFTFTISLQPEDATYYCQNV ESPYTFGQGTKVEIK	308
AL166	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWKYQKPGKAPK LLIYGATGLADGVPSRFSGSGSGRDFTFTISLQPEDATYYCQNV SEPYTFGQGTKVEIK	309
AL194	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASMPFLHALNWKYQKPGKAPK LLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGRDFTFTISLQPEDATYYCQNV LS1 PETFGQGTKVEIK	310
AL195	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASRSTFSALNWKYQKPGKAPK LLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGRDFTFTISLQPEDATYYCQNV EE PYTFGQGTKVEIK	311

Ngoài ra, thử nghiệm *in vitro* về hoạt tính ức chế sự tăng sinh đã được thực hiện trên dòng tế bào U-87 MG bằng cách sử dụng một phần của các kháng thể được tối ưu hóa ái lực, trong đó kết quả được trình bày trên Bảng 11.

Bảng 11. Hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* của kháng thể được tối ưu hóa ái lực chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hu8C4

Kháng thể	U-87 MG (Chất tự tiết GBM, HGF) Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC ₅₀ (nM)		Gấp số lần IC ₅₀
	Kháng thể được tối ưu hóa ái lực	hu8C4	
hu8C4 AH71	11,3	95,5	8,5
hu8C4 AH72	10,9	95,5	8,8
hu8C4 AH73	10,9	95,5	8,8
hu8C4 AH85	10,1	95,5	9,5
hu8C4 AL130	5,0	45,0	9,0
hu8C4 AL135	7,1	31,9	4,5
hu8C4 AL165	6,8	39,0	5,7
hu8C4 AL166	9,1	39,0	4,3
hu8C4 AL194	9,6	94,5	9,8
hu8C4 AL195	18,0	94,5	5,3

Như được trình bày trên Bảng 11, có thể xác định được rằng IC₅₀ của hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể được tối ưu hóa ái lực hu8C4 trong tế bào U-87 MG lên tới 5,0 - 18 nM, trong đó hiệu quả của nó tăng gấp 4,3 - 9,8 lần kháng thể ban đầu hu8C4. Các kết quả ở trên đại diện cho xét nghiệm được thực hiện trên một phần của các kháng thể có trình tự axit amin được trình bày trên Bảng 8-10, trong đó ái lực của kháng thể ban đầu hu8C4 đã được tối ưu hóa và tất cả các kháng thể được chọn dựa trên ái lực kháng nguyên thông qua quá trình chọn lọc. Do đó, có thể hy vọng rằng có thể có hiệu quả tương đương thích đáng cả đối với phần còn lại của các kháng thể được tối ưu hóa ái lực cũng như các kháng thể với tổ hợp của các CDR vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được trình diện.

Đối với một thí nghiệm bổ sung, 10 loại kháng thể được tối ưu hóa ái lực đã được tạo ra bằng cách kết hợp các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Sự kết hợp cụ thể của trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được trình bày trên Bảng 12.

Bảng 12. Danh mục trình tự vùng biến đổi được kết hợp của kháng thể được tối ưu hóa ái lực

	Vùng biến đổi chuỗi nặng	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ
hu8C4 AH71	AH71(SEQ ID NO: 302)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH85	AH85(SEQ ID NO: 305)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AL194	Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 23)	AL194(SEQ ID NO: 310)
hu8C4 A56	AH85(SEQ ID NO: 305)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A62	AH72(SEQ ID NO: 303)	AL130(SEQ ID NO: 306)
hu8C4 A71	AH73(SEQ ID NO: 304)	AL135(SEQ ID NO: 307)
hu8C4 A72	AH73(SEQ ID NO: 304)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A73	AH73(SEQ ID NO: 304)	AL166(SEQ ID NO: 309)
hu8C4 A76	AH73(SEQ ID NO: 304)	AL195(SEQ ID NO: 311)
hu8C4 A78	AH71(SEQ ID NO: 302)	AL130(SEQ ID NO: 306)

Sau đó, hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u được đánh giá bằng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 1 ở trên, trong đó kết quả của chúng được trình bày trên Bảng 13 và Fig.3.

Bảng 13. Hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* của kháng thể được tối ưu hóa ái lực

Kháng thể	U-87 MG (Chất tự tiết GBM, HGF)		Gấp số lần
	Kháng thể được tối ưu hóa ái lực	hu8C4	
hu8C4 AH71	3,6	49,0	13,6
hu8C4 AH85	3,2	49,0	15,2
hu8C4 AL194	5,3	49,0	9,2
hu8C4 A56	1,7	49,0	28,5
hu8C4 A62	1,8	49,0	27,6

hu8C4 A71	5,0	49,0	9,7
hu8C4 A72	3,6	49,0	13,8
hu8C4 A73	4,0	49,0	12,3
hu8C4 A76	4,3	49,0	11,3
hu8C4 A78	2,6	49,0	18,9

Như được trình bày trên Bảng 13 ở trên, có thể xác định được rằng hu8C4 cũng như 10 loại kháng thể chủ chốt với sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tối ưu hóa ái lực của chúng cũng cho thấy hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u. Cụ thể là, IC₅₀ của 10 loại kháng thể lên tới 1,7 - 5,3 nM và có thể xác định được rằng chúng có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u, cao gấp 9,2 - 28,5 lần so với kháng thể hu8C4 ban đầu.

Ví dụ 6. Sản xuất kháng thể đặc hiệu kép và hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u in vitro

Để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép gắn đặc hiệu với các đoạn c-Met và EGFR, Erbitux và Vectibix scFv, vốn liên kết đặc hiệu với EGFR, được liên kết tương ứng với đầu C của kháng nguyên c-Met bởi đoạn nối GGGGSGGGGS (SEQ. NO: 312)

Để tăng tính ổn định của scFv, đoạn dư thứ 44 của chuỗi nặng và đoạn dư thứ 100 của chuỗi nhẹ đã được thay thế bằng xystin (Reiter Y. và cộng sự, Biochemistry 33(18):5451-5459 (1994)). Erbitux và Vectibix scFv. Các trình tự Erbitux và Vectibix scFv, các trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu kép và sự kết hợp của các vùng khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép được trình bày trên Bảng 14 và 15 sau đây.

Bảng 14. Danh mục trình tự axit amin của kháng thể EGFR dùng để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép cũng như kháng thể đặc hiệu kép

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Erbitux scFv HL	QVQLKQSGPGLVQPSQ SLSITCTVSGFSLTNY GVHWVRQSPGKCLEWL GVIWSSGNTDYNTPTFT	313

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	SRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDAIYYCA RALTYDYEFAYWGQG TLVTVSAGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDILLT QSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQ QRTNGSPRLLIKAYASE SISGIPSRFSGSGSGT DFTLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGCG TKLELK	
Erbitux scFv LH	DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRTNGSPRLI KYASESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPT TFGCGTKLELKGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSQ VQLKQSGPGLVQPSQS LSITCTVSGFSLTNYG VHWVRQSPGKCLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTS RLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDAIYYCAR ALTYDYEFAYWGQGT LVTVSA	314
Vectibix scFv	QVQLQESGPGLVKPSE TSLTCTVSGGSVSSG DYYWTWIRQSPGKCLE WIGHIYSGNTNYPNPS LKSRLTISIDTSKTQF SLKLSSVTAADTAIYY CVRDRVTGAFDIWGQG TMVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTI TCQASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGT DFTFTISSLQPEDIAT YFCQHFHDLPLAFGCG TKVEIK	315
Chuỗi nặng hu8C4 x Erbitux scFv HL	EVQLVESGGGLVQPGG SRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGSGNTHFSARF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL	316

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	GTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSGF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSLITCTVSGF SLTNYGVHWVRQSPGK CLEWLGVIWSSGNTDY NTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSNDA IYYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSAGGGG SGGGSGGGGSGGGGS DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRRTNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQNNNWPT TFGCGTKLELK	
Chuỗi nặng hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKLEWI GEIFPGWGNTHFSARF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGQDYGFLYWQGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSGF FLYSKLTVDKSRWQQG	317

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSL SITCTVSGF SLTNYGVHWVRQSPGK CLEWLGVIWSSGNTDY NTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSNDA IYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAGGGG SGGGSGGGGSGGGGS DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRTNGSPRLI KYASESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQNNNWPT TFGCGTKLELK	
Chuỗi nặng hu8C4 AH72 x Erbitux scFv HL	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKLEWI GEIFPGWGNTHFSRSP TPRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGLYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGFS FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSL SITCTVSGF SLTNYGVHWVRQSPGK CLEWLGVIWSSGNTDY NTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSNDA IYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAGGGG SGGGSGGGGSGGGGS DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRTNGSPRLI	318

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	KYASESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPT TFGCGTKLELK	
Chuỗi nặng hu8C4 AH73 x Erbitux scFv HL	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNSHVVSFR KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGFS FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSLITCTVSGF SLTNYGVHWVRQSPGK CLEWLGVIWSGGNTDY NTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSNDA IYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLVTVSAGGGG SGGGGSGGGGSGGGGS DILLTQSPVILSVSPG ERVFSFSCRASQSIGTN IHWYQQRTNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPT TFGCGTKLELK	319
Chuỗi nặng hu8C4 AH85 x	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNSHVVSFR KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGQDYGFYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG	320

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Erbitux scFv HL	ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSLITCTVSGF SLTNYGVHWVRQSPGK CLEWLGVWISGGNTDY NTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSNDA IYYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSAGGGG SGGGSGGGGSGGGGS DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPT TFGCGTKLELK	
Chuỗi nặng hu8C4 x Erbitux scFv LH	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGSGNTHFSARF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE	321

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	NNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSDILLTQSPVIL SVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGS PRLLIKYASESISGIP SRFSGSGSGTDFTLSI NSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGCGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSL SITCTVSGFS LTNYGVHWVRQSPGKC LEWLGVIWSGGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAY WGQGT LVTVSA	
Chuỗi nặng hu8C4 AH71 x Erbitux scFv LH	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNTHFSARF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGQDYGFLYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSDILLTQSPVIL SVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGS PRLLIKYASESISGIP SRFSGSGSGTDFTLSI NSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGCGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSL SITCTVSGFS	322

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	LTNYGVHWVRQSPGKC LEWLGVIWSSGGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSA	
Chuỗi nặng hu8C4 AH72 x Erbitux scFv LH	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNTHFSRSP TPRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFLLYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSGF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGS DILLTQSPVIL SVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGS PRLLIKYASESISGIP SRFSGSGSGTDFLSI NSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGCGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSLITCTVSGFS LTNYGVHWVRQSPGKC LEWLGVIWSSGGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSA	323
Chuỗi nặng hu8C4 AH73 x	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNSHVVS RF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFLLYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLA	324

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Erbitux scFv LH	PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSDILLTQSPVIL SVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGS PRLLIKYASESISGIP SRFSGSGSGTDFTLSI NSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGCGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSLITCTVSGFS LTNYGVHWVRQSPGKC LEWLGVIWSSGGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAY WGQGTLLVTVSA	
Chuỗi nặng hu8C4 AH85 x Erbitux scFv LH	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNSHVVSFRF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGQDYGFLYWGGGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD	325

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSDILLTQSPVIL SVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGS PRLLIKYASESISGIP SRFSGSGSGTDFTLSI NSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGCGTKLELK GGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSLSTCTVSGFS LTNYGVHWVRQSPGKC LEWLGVIWSSGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSA	
Chuỗi nặng hu8C4 x Vectibix scFv	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGSGNTHFSARF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFLLYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSGVQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGG SVSSGDYYWTWIRQSP GKCLEWIGHIYYSGNT NYNPSLKSRLTISIDT SKTQFSLKLSSVTAAD TAIYYCVRDRVTGAFD IWGQGTMVTVSSGGGG	326

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	SGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLI YDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTFITSSSLQP EDIATYFCQHFDHLPL AFGCGTKVEIK	
Chuỗi nặng hu8C4 AH71 x Vectibix scFv	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNTHFSARF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGQDYGFLYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGG SVSSGDYYWTWIRQSP GKCLEWIGHIYYSGNT NYNPSLKSRLTISIDT SKTQFSLKLSSVTAAD TAIYYCVRDRVGTGAFD IWGQGTMTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLI YDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTFITSSSLQP EDIATYFCQHFDHLPL AFGCGTKVEIK	327
Chuỗi nặng hu8C4 AH72 x	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNTHFSRSP TPRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC	328

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Vectibix scFv	AGGDYGFLYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSGF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLQESGPGI VKPSETLSLTCTVSGG SVSSGDYYWTWIRQSP GKCLEWIGHIYYSGNT NYNPSLKSRLTISIDT SKTQFSLKLSSVTAAD TAIYYCVRDRVTGAFD IWGQGTMTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCQASQDISNY LNWFYQQKPGKAPKLLI YDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFFTISSSLQP EDIATYFCQHFHPL AFGCGTKVEIK	
Chuỗi nặng hu8C4 AH73 x Vectibix scFv	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNSHVVSFRF KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGGDYGFLYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS	329

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGG SVSSGDYYWTWIRQSP GKCLEWIGHIYYSGNT NYNPSLKSRLTISIDT SKTQFSLKLSSVTAAD TAIYYCVRDRVTGAFD IWGQGTMTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLI YDASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTFITISLQP EDIATYFCQHFHDLPL AFGCGTKVEIK	
Chuỗi nặng hu8C4 AH85 x Vectibix scFv	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFSDY YINWVRQAPGKGLEWI GEIFPGWGNSHVVSFR KGRATLSADKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC AGQDYGFLYWGGTLV TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSF FLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSQVQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGG SVSSGDYYWTWIRQSP GKCLEWIGHIYYSGNT NYNPSLKSRLTISIDT SKTQFSLKLSSVTAAD	330

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
	TAIYYCVRDRVTGAFD IWGQGTMTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLASVG DRVTITCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLI YDASNLETGVPSRFSG SSGTDFTFITISLQP EDIATYFCQHFDHLPL AFGCGTKVEIK	

Bảng 15. Danh mục trình tự vùng biến đổi được kết hợp của kháng thể đặc hiệu kép

	Vùng biến đổi chuỗi nặng	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ
hu8C4 x Erbitux scFv HL	hu8C4 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 316)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 317)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH85 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH85 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 320)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AL194 x Erbitux scFv HL	hu8C4 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 316)	AL194(SEQ ID NO: 310)
hu8C4 A56 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH85 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 320)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A62 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH72 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 318)	AL130(SEQ ID NO: 306)
hu8C4 A71 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 319)	AL135(SEQ ID NO: 307)
hu8C4 A72 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 319)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A73 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 319)	AL166(SEQ ID NO: 309)

	Vùng biến đổi chuỗi nặng	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ
hu8C4 A76 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 319)	AL195(SEQ ID NO: 311)
hu8C4 A78 x Erbitux scFv HL	hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL (SEQ ID NO: 317)	AL130(SEQ ID NO: 306)
hu8C4 x Erbitux scFv LH	hu8C4 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 321)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH71 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH71 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 322)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH85 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH85 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 325)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AL194 x Erbitux scFv LH	hu8C4 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 321)	AL194(SEQ ID NO: 310)
hu8C4 A56 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH85 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 325)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A62 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH72 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 323)	AL130(SEQ ID NO: 306)
hu8C4 A71 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 324)	AL135(SEQ ID NO: 307)
hu8C4 A72 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 324)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A73 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 324)	AL166(SEQ ID NO: 309)
hu8C4 A76 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH73 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 324)	AL195(SEQ ID NO: 311)
hu8C4 A78 x Erbitux scFv LH	hu8C4 AH71 x Erbitux scFv LH (SEQ ID NO: 332)	AL130(SEQ ID NO: 306)

	Vùng biến đổi chuỗi nặng	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ
hu8C4 x Vectibix scFv	hu8C4 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 326)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH71 x Vectibix scFv	Hu8C4 AH71 x Vectibix sscFv (SEQ ID NO: 327)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AH85 x Vectibix scFv	hu8C4 AH35 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 330)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu8C4-1 (SEQ ID NO: 21)
hu8C4 AL194 x Vectibix scFv	hu8C4 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 326)	AL104(SEQ ID NO: 310)
hu8C4 A56 x Vectibix scFv	hu8C4 AH85 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 330)	AL165(SEQ ID NO: 303)
hu8C4 A62 x Vectibix scFv	hu8C4 AII72 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 323)	AL130(SEQ ID NO: 306)
hu8C4 A71 x Vectibix scFv	hu8C4 AII73 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 329)	AL135(SEQ ID NO: 307)
hu8C4 A72 x Vectibix scFv	hu8C4 AH73 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 329)	AL165(SEQ ID NO: 308)
hu8C4 A73 x Vectibix scFv	hu8C4 AII73 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 329)	AL166(SEQ ID NO: 309)
hu8C4 A76 x Vectibix scFv	hu3C4 AH73 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 329)	AL195(SEQ ID NO: 311)
hu8C4 A78 x Vectibix scFv	hu8C4 AII71 x Vectibix scFv (SEQ ID NO: 327)	AL130(SEQ ID NO: 306)

Sau đó, hiệu quả chống ung thư trong ống nghiệm của kháng thể đặc hiệu kép liên kết với các mảnh Erbitux và Vectibix scFv đã được đánh giá trong dòng tế bào khối u U-87 MG bằng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 1.

Ngoài ra, hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u đã được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào ung thư phổi NCI-H1993, NCI-H292 và NCI-H820. Cụ thể là, liên quan đến dòng tế bào NCI-H1993 (ATCC, #CRL-5909) có gen c-Met được biểu hiện quá mức, dòng tế bào NCI-H292 (ATCC, #CRL-1848) với EGFR và c-Met được biểu hiện bình thường và NCI-H820 (ATCC, #HTB-181) với threonin (T) bị đột biến thành methionin (M) trong axit amin EGFR số 790, hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u được thực hiện bằng phương pháp sau. Mỗi dòng tế bào được pha loãng trong môi trường RPMI-1640 (Gibco, #A10491) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia với mật độ 2×10^3 vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, tiếp đó đĩa thu được này được nuôi qua đêm trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Sau đó, mỗi giếng của đĩa được thay thế bằng 100 μl môi trường không có huyết thanh, sau đó đĩa thu được này được nuôi cấy ở 37°C , 5% CO_2 trong 18 giờ. Sau đó, môi trường được thay thế bằng 100 μl môi trường RPMI-1640 chứa 2% (v/v) FBS hoặc HGF 50 ng/ml, sau đó kháng thể thử nghiệm được pha loãng tuần tự với tỷ lệ 1/10 (cụ thể là 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM và 1 pM) để đạt 0,001 nM ở nồng độ cuối cùng từ nồng độ 100 nM, tiếp đó kháng thể thu được này được thêm 100 μl vào mỗi giếng. Sau đó, đĩa được nuôi cấy trong 5 ngày trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 , rồi môi trường được loại bỏ, dung dịch TCA được thêm 200 μl vào mỗi giếng để cố định tế bào. Ngoài ra, các tế bào của đĩa được nhuộm theo phương pháp xét nghiệm so màu SRB thông thường, sau đó mật độ quang học của mỗi giếng được đo ở bước sóng 540 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa vi thể.

Kết quả của hoạt tính ức chế sự tăng sinh trong từng dòng tế bào ở trên được trình bày trên Bảng 16 và 17 và Fig.4 và 5.

Bảng 16. Hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* của kháng thể đặc hiệu kép

Kháng thể đặc hiệu kép	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC_{50} (nM)	
	U-87 MG (Chất tự tiết GBM, HGF)	NCI-H1993 (NSC-LC, c-Met được khuếch đại)
hu8C4 x Vectibix scFv	0,06	0,32
hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL	0,06	0,41

hu8C4 AH85 x Erbitux scFv HL	0,06	0,48
hu8C4 AL194 x Erbitux scFv HL	0,07	0,64
hu8C4 A56 x Erbitux scFv HL	0,07	0,57
hu8C4 A62 x Erbitux scFv HL	0,08	0,65
hu8C4 A70 x Erbitux scFv HL	0,07	0,67
hu8C4 A72 x Erbitux scFv HL	0,06	0,49
hu8C4 A73 x Erbitux scFv HL	0,06	0,50
hu8C4 A76 x Erbitux scFv HL	0,06	0,49
hu8C4 A78 x Erbitux scFv HL	0,06	0,76

Bảng 17. Hoạt tính ức chế sự tăng sinh dòng tế bào ung thư phổi *in vitro* của kháng thể đặc hiệu kép

Kháng thể đặc hiệu kép	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC ₅₀ (nM)			
	NCI-H292 (NSCLC)		NCI-H820 (NSCLC : EGFR T790M, c-Met được khuếch đại)	
	Không HGF	HGF 50 ng/ml	Không HGF	HGF 50 ng/ml
hu8C4 x Vectibix scFv	0,70	0,24	> 100	4,2
hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL	0,51	0,22	> 100	8,5
hu8C4 AH85 x Erbitux scFv HL	0,43	0,23	> 100	7,6
hu8C4 AL194 x Erbitux scFv HL	0,41	0,24	> 100	19,0
hu8C4 A56 x Erbitux scFv HL	0,42	0,29	> 100	21,7
hu8C4 A62 x Erbitux scFv HL	0,74	0,28	> 100	40,2
hu8C4 A70 x Erbitux scFv HL	0,74	0,23	> 100	40,9
hu8C4 A72 x Erbitux scFv HL	0,78	0,23	> 100	19,5
hu8C4 A73 x Erbitux scFv HL	0,87	0,26	> 100	38,4
hu8C4 A76 x Erbitux scFv HL	0,73	0,21	> 100	10,3

Kết quả là, không có sự khác biệt về hiệu quả giữa các kháng thể đặc hiệu kép được sản xuất từ dòng tế bào khối u U-87 MG bằng phương pháp này và có thể xác định được rằng hiệu quả ức chế hoạt động của nó cao hơn khoảng 15 lần so với IC_{50} của kháng thể được tối ưu hóa hu8C4. Ngoài ra, theo kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bằng cách sử dụng các dòng tế bào ung thư phổi NCI-H1993, NCI-H292 và NCI-H820, có thể xác định được rằng không có sự khác biệt về hiệu quả giữa các kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra.

Các kết quả cho thấy rằng kháng thể của sáng chế có tác dụng ức chế sự tăng sinh đối với tất cả các loại ung thư bất kể sự biểu hiện quá mức hoặc đột biến của c-Met và EGFR, do đó có thể được sử dụng hiệu quả trong phòng và điều trị các loại ung thư này

Ví dụ 7. Đánh giá so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong ống nghiệm của kháng thể đặc hiệu kép so với liệu pháp kết hợp

Tám loại ung thư đã được sử dụng để so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u giữa liệu pháp kết hợp của từng kháng thể hướng đích lần lượt là c-Met và EGFR và kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế.

Cụ thể là, hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u đã được đánh giá trong dòng tế bào ung thư phổi NCI-H292 (ATCC, #CRL-1848), dòng tế bào u nguyên bào đệm tự tiết HGF-U-87 MG (ATCC, #HTB-14), các dòng tế bào ung thư phổi NCI-H1648 (ATCC #CRL-5882) và NCI-H596 (ATCC #HTB-178), HCC827 (ATCC, #CRL2868), dòng tế bào ung thư ruột kết LS174T (ATCC, #CL-188), dòng tế bào ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC) BT20 (ATCC, #HTB-19) và dòng tế bào ung thư tuyến tụy KP4 (JCRB, #RCB1005). Dòng tế bào NCI-H1648 được đặc trưng bởi sự biểu hiện bình thường của EGFR và c-Met, dòng tế bào NCI-H596 được đặc trưng bởi sự mất một số trình tự exon số 14 của gen MET, và dòng tế bào HCC827 được đặc trưng bởi sự mất một số chuỗi exon số 19 của gen EGFR. Ngoài ra, dòng tế bào LS174T có đột biến KRAS và KP4 được đặc trưng bởi HGF tự tiết.

Dòng tế bào U-87 MG được đánh giá bằng phương pháp của Ví dụ 1 và dòng tế bào NCI-H292 được đánh giá bằng phương pháp của Ví dụ 6. Ngoài ra, các dòng tế bào NCI-H1648, NCI-H596 và HCC827 đã được pha loãng trong môi trường RPMI -1640 (Gibco, #A10491) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia

với mật độ $2,0 \times 10^3$ vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng. Dòng tế bào LS174T đã được pha loãng trong môi trường DMEM (Gibco, #11995-065) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia với mật độ $2,0 \times 10^3$. Dòng tế bào BT20 được pha loãng trong môi trường EMEM (ATCC, #30-2003) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia với mật độ $3,0 \times 10^3$. Và, dòng tế bào KP4 đã được pha loãng trong môi trường RPMI-1640 (Gibco, #A10491) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được chia với mật độ $1,5 \times 10^3$, tiếp đó đĩa thu được này được nuôi qua đêm trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Sau đó, mỗi giếng của đĩa được thay thế bằng 100 μl môi trường không có huyết thanh, sau đó đĩa thu được này được nuôi cấy ở 37°C , 5% CO_2 trong 18 giờ. Sau đó, môi trường được thay thế bằng 100 μl môi trường RPMI-1640 chứa 2% (v/v) FBS hoặc HGF 50 ng/ml, sau đó kháng thể thử nghiệm được pha loãng tuần tự với tỷ lệ 1/10 (cụ thể là 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM và 1 pM) để đạt 1 pM ở nồng độ cuối cùng từ nồng độ 100 nM, tiếp đó kháng thể thu được này được thêm 100 μl vào mỗi giếng. Sau đó, đĩa được nuôi cấy trong 5 ngày trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 , rồi môi trường được loại bỏ, dung dịch TCA được thêm 200 μl vào mỗi giếng để cố định tế bào. Ngoài ra, các tế bào của đĩa được nhuộm theo phương pháp xét nghiệm so màu SRB thông thường, cuối cùng mật độ quang học của mỗi giếng được đo ở bước sóng 540 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa vi thể.

Kết quả của Ví dụ này được trình bày trên Bảng 18-21 và Fig.6-8.

Bảng 18. Đánh giá so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* giữa liệu pháp kết hợp thể đặc hiệu kép ở các dòng tế bào U-87 MG và NCI-H292

Kháng thể	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC_{50} (nM)		
	U-87 MG (Chất tự tiết GBM, HGF)	NCI-H292 (NSCLC)	
		Không có HGF	HGF 50 ng/ml
Vectibix	>100	0,09	>100
hu8C4	83,9	>100	>100
hu8C4 + Vectibix kết hợp	79,0	0,10	0,34
hu8C4 x Vectibix scFv	0,4	0,15	0,12
C-EMI-MAb	> 100	5,29	5,73

C-LA480	858,8	-	-
C-0A-5D5	171,9	-	-
C-AbF46	> 100	-	-

Bảng 19. Đánh giá so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* giữa liệu pháp kết hợp thể đặc hiệu kép ở các dòng tế bào NCI-H1648 và NCI-H596

Kháng thể	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC ₅₀ (nM)			
	NCI-H1648 (NSCLC)		NCI-H596 (NSCLC, c-Met đột biến)	
	No HGF	HGF 50 ng/ml	Không có HGF	HGF 50 ng/ml
Vectibix	> 100	> 100	> 100	> 100
hu8C4	> 100	> 100	> 100	2,3
hu8C4 + Vectibix kết hợp	> 100	> 100	> 100	2,4
hu8C4 x Vectibix scFv	15,4	29,5	> 100	0,4

Bảng 20. Đánh giá so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* giữa liệu pháp kết hợp thể đặc hiệu kép ở các dòng tế bào LS174T, BT20 và KP4

Kháng thể	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC ₅₀ (nM)		
	LS174T (Ruột, KRAS G12V)	BT20 (TNBC)	KP4 (Tụy)
	HGF 50ng/ml	HGF 50ng/ml	Chất tự tiết HGF
Vectibix	> 100	> 100	> 100
hu8C4	> 100	> 100	42,0
hu8C4 + Vectibix kết hợp	34,4	> 100	36,4
hu8C4 x Vectibix scFv	33,4	~ 100	27,0
C-EM1-MAb	-	> 100	> 100

Bảng 21. Đánh giá so sánh hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* giữa liệu pháp kết hợp thể đặc hiệu kép ở các dòng tế bào HCC827 và NCI-H596

Kháng thể	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC ₅₀ (nM)		
	HCC827 (NSCLC, EGFR đột biến)		NCI-H596 (NSCLC, c-Met đột biến)
	Không có HGF	HGF 50 ng/ml	HGF 50 ng/ml
Tarceva	2,96	> 100	> 100
Vectibix	> 100	> 100	> 100
hu8C4	> 100	> 100	67,2
hu8C4 x Vectibix scFv	> 100	> 100	0,8
LA480	> 100	> 100	> 100
INC280	> 100	> 100	42,5
EMD1214063	> 100	> 100	68,2
Xalkori	-	-	87,3
Tarceva + hu8C4 kết hợp	3,24	3,09	
Tarceva + hu8C4 x Vectibix scFv kết hợp	2,35	2,42	
Tarceva + LA480 kết hợp	3,24	4,78	
Tarceva + INC280 kết hợp	3,06	2,88	
Tarceva + EMD1214063 kết hợp	2,80	4,10	

Kết quả là, có thể xác định được rằng khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế tốt hơn so với hu8C4, Vectibix hoặc liệu pháp kết hợp của hai loại kháng thể trong cả 8 loại dòng tế bào khối u. Ngoài ra, có thể xác định được rằng kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u rất tốt đối với các dòng tế bào U-87MG, NCI-H292, BT20 và KP4 khi so sánh với EM1-MAb (Janssen) được sử dụng làm kháng thể đặc hiệu kép đối chứng.

Hơn nữa, có thể xác định được rằng cả hu8C4 và hu8C4 x Vectibix scFv đều có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tốt hơn so với kháng thể đối chứng, khi so sánh với LA480 (Lilly), OA-5D5 (Genentech) và AbF46 (Samsung) vốn là các kháng thể hướng c-Met trong các dòng tế bào U-87MG.

Ngoài ra, Tarceva, chất ức chế tyrosin kinaza EGFR trong dòng tế bào HCC827, cho thấy sự kháng thuốc trong điều kiện xử lý HGF, nhưng có thể xác định được rằng khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u được thể hiện tốt khi được xử lý kết hợp với Tarceva, hu8C4, hu8C4 x Vectibix hoặc chất ức chế c-Met chất trong điều kiện như vậy.

Ngoài ra, qua kết quả so sánh các chất ức chế EGFR và các chất ức chế c-Met trong dòng tế bào NCI-H596, có thể xác định được rằng khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của hu8C4 x Vectibix scFv tốt so với hướng đích đơn lẻ EGFR hoặc c-Met.

Ví dụ 8. Đo khả năng gắn với ECD (BIAcore)

Sau đó, để đo khả năng gắn của kháng thể c-Met theo sáng chế với miền ngoại bào (ECD), liên kết kháng thể c-Met và kháng thể đặc hiệu kép với c-Met ECD và EGFR ECD được đo giữa người và khi đuôi dài bằng cách sử dụng BIAcore.

Cụ thể là, c-Met ECD người (ACROBiosystems, MET-H5227), c-Met Ecd khi đuôi dài (SiNo. ECD (SiNo. Biological, 90285-C08B) đã được sử dụng.

Trước hết, để thu được kháng thể kháng c-Met và kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể kháng IgG người đặc hiệu Fc (SouthernBiotech, 2047-01) đã được gắn vào chip cảm biến CM5 ở mức 10000 RU. Các kháng thể được pha loãng trong dung dịch đệm HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, NaCl 0,15 M, 3 mM EDTA và 0,005% (v/v) chất hoạt động bề mặt P20) ở nồng độ 1-2 µg/ml, sau đó các kháng thể tạo ra đã được tiêm vào chip CM5 cùng với kháng Ig Fc người được cố định vào đó ở tốc độ dòng 30 µl/phút trong 10-120 giây, rồi sau đó được bắt giữ trong khoảng 150-200 RU. Mỗi kháng nguyên được sử dụng sau khi được pha loãng ở 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 và 0,15625 nM, sau đó các kháng nguyên thu được này được tiêm tuần tự từ nồng độ thấp. Tiếp đó, các kháng nguyên thu được này được tiêm với tốc độ dòng chảy 30 µl/phút trong 5 phút để thực hiện gắn, sau đó đệm chạy được tiêm vào trong 10 - 15 phút để tiến hành phân ly. 15 µl của Glyxin-HCl 10 mM (pH 1,5) đã được sử dụng để phục hồi chip. Tốc độ gắn và phân

ly cho mỗi chu kỳ được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình “liên kết Langmuir” trong phần mềm BIAevaluation phiên bản 4.1, và dữ liệu biacore được tóm tắt trên Bảng 22 và 23.

Bảng 22. Đo ái lực với c-Met ECD

hu8C4	Hằng số liên kết (K_{on} , 1/Ms)	Hằng số phân ly (K_{off} , 1/s)	Ái lực với kháng nguyên (K_D , M)
c-Met người	$6,77 \times 10^5$	$2,148 \times 10^{-4}$	$3,173 \times 10^{-10}$
c-Met khỉ đuôi dài	$7,467 \times 10^5$	$3,447 \times 10^{-4}$	$4,616 \times 10^{-10}$
hu8C4 AH71	Hằng số liên kết (K_{on} , 1/Ms)	Hằng số phân ly (K_{off} , 1/s)	Ái lực với kháng nguyên (K_D , M)
c-Met người	$8,306 \times 10^5$	$8,301 \times 10^{-5}$	$9,993 \times 10^{-11}$
c-Met khỉ đuôi dài	-	-	-
hu8C4 x Vectibix scFv	Hằng số liên kết (K_{on} , 1/Ms)	Hằng số phân ly (K_{off} , 1/s)	Ái lực với kháng nguyên (K_D , M)
c-Met người	$7,339 \times 10^5$	$2,041 \times 10^{-4}$	$2,78 \times 10^{-10}$
c-Met khỉ đuôi dài	$7,77 \times 10^5$	$3,37 \times 10^{-4}$	$4,338 \times 10^{-10}$

Bảng 23. Đo ái lực với EGFR ECD

Vectibix	Hằng số liên kết (K_{on} , 1/Ms)	Hằng số phân ly (K_{off} , 1/s)	Ái lực với kháng nguyên (K_D , M)
EGFR người	$5,278 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,841 \times 10^{-10}$
EGFR khỉ đuôi dài	$9,37 \times 10^5$	$1,963 \times 10^{-4}$	$2,090 \times 10^{-10}$
hu8C4 x Vectibix scFv	Hằng số liên kết (K_{on} , 1/Ms)	Hằng số phân ly (K_{off} , 1/s)	Ái lực với kháng nguyên (K_D , M)
EGFR người	$7,776 \times 10^4$	$1,257 \times 10^{-4}$	$1,617 \times 10^{-9}$
EGFR khỉ đuôi dài	$1,424 \times 10^5$	$1,274 \times 10^{-4}$	$8,942 \times 10^{-10}$

Dữ liệu được sử dụng để chứng minh rằng các kháng thể đặc hiệu kép hu8C4, hu8C4 x Vectibix scFv của sáng chế liên kết với c-Met ECD của người và khi đuôi dài với ái lực tốt.

Ví dụ 9. Đo khả năng gắn kháng thể c-Met với c-Met ECD, EGFR ECD giữa các loài động vật khác nhau (ELISA)

Liên kết giữa kháng thể c-Met và kháng thể đặc hiệu kép với c-Met ECD và EGFR ECD giữa chuột, khi đuôi dài và người được đo bằng ELISA.

Cụ thể là, c-Met chuột (SiNo. Biological Inc, 50622-M08H), c-Met khi đuôi dài (SiNo. Biological Inc, 90304-C08H), c-Met người (R&D Systems, 358-MT), EGFR chuột (SiNo. Biological Inc, 51091-M08H), EGFR khi đuôi dài (SiNo. Biological, 90285-C08B) và kháng nguyên EGFR người (Abcam, 155639) được chia vào đĩa 96 giếng với nồng độ 2 µg/ml, sau đó đĩa thu được này được cho phản ứng ở 4°C qua đêm. Sau khi được đình chỉ phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix scFv đã được pha loãng liên tục với tỷ lệ 1/5 từ 100 nM để đo khả năng liên kết của nó trong 7 khoảng nồng độ (cụ thể là: 100 nM, 20 nM, 4 nM, 800 pM, 160 pM, 32 pM và 6,4 pM).

Sau khi gắn kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix scFv ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, IgG kháng người, kháng thể liên hợp HRP đặc hiệu mảnh F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, 109-035-097) được pha loãng với tỷ lệ 1 : 2500, sau đó kháng thể thu được này được để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sự phát triển màu được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch TMB (Sigma, T4444), trong đó giá trị của nó được đo ở mật độ quang học tại bước sóng 450 nm và kết quả ELISA của nó được trình bày trên Fig.9.

Kết quả là, có thể xác định được rằng kháng thể đơn đặc hiệu hu8C4 và kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix scFv không gắn với c-Met chuột và EGFR chuột, nhưng gắn với c-Met và EGFR của khi và người. Ngoài ra, có thể xác định được rằng kháng thể IgG ở người, được sử dụng làm nhóm đối chứng âm, hoàn toàn không liên kết. Các kết quả trên cho thấy rằng kháng thể c-Met của sáng chế chỉ đặc hiệu với c-Met và EGFR của người và khi.

Ví dụ 10. Phản ứng chéo của kháng thể c-Met với các thụ thể khác nhau trên bề mặt tế bào

Tính đặc hiệu của kháng thể hu8C4 gắn đặc biệt với c-Met theo sáng chế cũng như phản ứng chéo của nó với các kháng nguyên tyrosin kinaza thụ thể khác được phân tích bằng phương pháp ELISA gián tiếp, và 5 kháng nguyên FGF R3, VEGFR R2, IGF IR, PDGF R và RON đã được chọn ra từ tyrosin kinaza chính để thực hiện phân tích.

Trong ví dụ này, khảm Fc c-Met người (R&D systems, 358-MT_CF), khảm Fc FGF R3 (IIIc) người (R&D system, 766-FR), IGF-I R người (R&D systems, 391-GR-050), khảm Fc PDGF R β người (R&D systems, 385-PR_CF), khảm Fc VEGF R2 người (R&D systems, 357-KD_CF) và MSP R/Ron người (R&D systems, 1947-MS-050) đã được sử dụng làm kháng nguyên.

Mỗi kháng nguyên được pha loãng trong dung dịch đệm cacbonat-bicacbonat 0,05 M (Sigma, C3041) ở nồng độ 1 μ g/ml, sau đó kháng nguyên thu được này được thêm vào từng giếng của đĩa 96 giếng (Corning, #2592), đĩa thu được này được tráng ở 4°C qua đêm. Đĩa được rửa một lần bằng TBS-T, sau đó TBS-T chứa 4% sữa tách béo được thêm 200 μ l vào mỗi giếng của đĩa thu được để ức chế liên kết không đặc hiệu, tiếp đó đĩa được để phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó, đĩa được rửa một lần bằng dung dịch đệm TBS-T, rồi kháng thể sơ cấp được pha loãng liên tục trong dung dịch đệm TBS-T chứa 2% sữa tách béo từ nồng độ cao nhất 30 nM đến nồng độ 0,002 nM, tiếp đó thêm 100 μ l kháng thể thu được vào mỗi giếng, rồi được để phản ứng ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi được rửa ba lần bằng dung dịch đệm TBS-T, chuỗi nhẹ kappa kháng người-peroxidaza (Sigma, A7164) đã được pha loãng với tỷ lệ 1: 5000 làm kháng thể thứ cấp, sau đó thêm 100 μ l kháng thể thu được vào mỗi giếng, rồi được để phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó, sau khi được rửa ba lần bằng dung dịch đệm TBS-T, dung dịch TMB (Sigma, T4444) được thêm 100 μ l vào mỗi giếng để thực hiện phản ứng phát triển màu, sau đó dung dịch amoni sulfat 2 N được thêm 50 μ l vào mỗi giếng để dừng phản ứng. Mật độ quang được đo tại bước sóng 450 nm bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa vi thể và bước sóng tham chiếu là 570 nm được sử dụng. Mức độ gắn của kháng thể kháng c-Met với mỗi kháng nguyên tương ứng với giá trị tín hiệu mật độ quang, trong đó kết quả được trình bày trên Bảng 24.

Bảng 24. Đặc hiệu liên kết của kháng thể hu8C4 kháng c-Met với các kháng nguyên khác nhau

Nồng độ kháng thể (nM)	hu8C4 liên kết ($A_{450nm} - A_{570nm}$)											
	c-Met		IGF-IR		RON		PDGFR		VEGFR2		FGFR3	
30,000	2,55	2,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02
6,000	1,96	2,03	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,01
1,200	1,81	1,74	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,01
0,240	1,48	1,54	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,01	0,00
0,046	0,76	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	0,00	0,00
0,010	0,21	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,00
0,002	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,00
Trống	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Như được trình bày trên bảng 24, kháng thể hu8C4 của sáng chế ưu tiên gắn với c-Met và được xác định rằng nó hầu như không liên kết với các kháng nguyên khác của FGF R3, VEGFR R2, IGF IR, PDGF R và RON.

Ví dụ 11. Hoạt tính nội hóa *in vitro* của kháng thể c-Met và hoạt tính ức chế mức c-Met của kháng thể đặc hiệu kép

Có thể xác định được rằng kháng thể c-Met của sáng chế có hoạt tính nội hóa *in vitro* trong các tế bào khối u cũng như có tác dụng làm giảm mức thụ thể bởi kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết đồng thời với c-Met và EGFR.

Trước hết, sự nội hóa kháng thể xảy ra do hoạt động sinh lý của thụ thể bình thường, trong đó, khi gắn với phối tử đặc hiệu, thụ thể thường biểu hiện bên ngoài các tế bào sẽ được hoạt hóa thông qua quá trình khử đồng hóa hoặc dị hóa và gây ra hiện tượng nhập bào liên quan đến thụ thể. Kháng thể đặc hiệu đối với thụ thể của tế bào có khả năng gây ra hiện tượng nhập bào và được nội hóa vào tế bào bằng cách gây ra hiện tượng nhập bào, do đó gây ra sự phân hủy của thụ thể, làm giảm mức độ biểu hiện của

nó, và có thể ức chế sự truyền tín hiệu bởi thụ thể nhất định. Một lượng kháng thể gắn ở bên ngoài tế bào có thể được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị phân loại tế bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang (FACS), do đó tìm ra lượng kháng thể được nội hóa bên trong các tế bào. Trong trường hợp gắn kháng thể bằng cách sử dụng kháng thể có FITC gắn với LC kappa kháng người dưới dạng kháng thể thứ cấp để đo chuỗi nhẹ kháng thể, có thể định lượng một lượng kháng thể không được nội hóa, nhưng vẫn gắn với một thụ thể mục tiêu bên ngoài các tế bào, do đó xác định được lượng kháng thể được nội hóa tương ứng. Có thể đo tín hiệu nền bằng cách gắn không đặc hiệu của kháng thể được sử dụng trong xét nghiệm bằng cách sử dụng kháng thể IgG ở người, không đặc hiệu với kháng nguyên, do đó đo tín hiệu huỳnh quang bằng liên kết đặc hiệu thực tế.

Trong ví dụ này, dòng tế bào MKN45 (#JCRB0254), là dòng tế bào ung thư dạ dày, đã được sử dụng để xác định hoạt tính nội hóa trong ống nghiệm của kháng thể c-Met bên trong các tế bào khối u. MKN45 biểu hiện thụ thể c-Met ở mức cao bằng cách khuếch đại gen MET, do đó sự phosphoryl hóa thụ thể c-Met được tạo ra theo cách không phụ thuộc HGF. Xét nghiệm đã được thực hiện như sau để xem liệu thụ thể c-Met có được nội hóa vào tế bào bằng kháng thể kháng c-Met hu8C4 hay không, do đó làm giảm mức độ biểu hiện.

Trước hết, các dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45 được chia với mật độ $5,0 \times 10^5$ cho mỗi giếng của đĩa 6 giếng chứa môi trường RPMI-1640 (2 ml) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó đĩa được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, RH 95% và 5% CO₂ trong 24 giờ. Kháng thể kháng c-Met được phân tích cũng như kháng thể kháng IgG (nhóm đối chứng) đã được pha loãng để đạt nồng độ cuối cùng là 100 nM, sau đó các kháng thể thu được này được để phản ứng qua đêm. Vì đĩa được sử dụng làm nhóm đối chứng không nội hóa được xử lý như kháng thể kháng c-Met và kháng thể IgG ở người (nhóm đối chứng), sau đó đĩa thu được này được để phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, các tế bào của mỗi giếng được thu thập với 1 ml dung dịch đệm phân tách tế bào không có enzym (Gibco, #13151), sau đó các tế bào được thu thập được rửa hai lần bằng PBS lạnh. Là kháng thể thứ cấp, LC-FITC kappa kháng người (LSBio #LS-C60539) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1: 2000, sau đó kháng thể thu được này được bổ sung, tiếp đó được để phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, tế bào được rửa hai lần bằng PBS, rồi tế bào thu được này được

cố định bằng 100 µl BD Cytofix (BD, #554655) và được rửa một lần bằng PBS, sao cho giá trị mật độ huỳnh quang trung bình (MFI) nhân FITC, mức độ nhuộm huỳnh quang, được đo bằng cách sử dụng máy phân tích tế bào nhu mô BD FACS Canto II. Một lượng kháng thể gắn bên ngoài tế bào đã thu được bằng công thức sau đây, trong đó kết quả của chúng được trình bày trên Bảng 25.

$$\text{Kháng thể gắn bề mặt (\%)} = \frac{[(\text{MFI}_{[\text{Thí nghiệm } 37^{\circ}\text{C}]} - \text{MFI}_{[\text{Đối chứng IgG}]}) / (\text{MFI}_{[\text{Đối chứng } 4^{\circ}\text{C}]} - \text{MFI}_{[\text{Đối chứng IgG}]})] \times 100}$$

Bảng 25. Đo khả năng tiếp nhận của các kháng thể đối chứng hu8C4 và OA-5D5 đối với dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45

Kháng thể	OA-5D5	hu8C4
FITC MFI [đối chứng IgG]	127	127
FITC MFI [đối chứng 4°C]	1763	1444
FITC MFI [Thí nghiệm 37°C]	1724	858
Kháng thể gắn bề mặt (%)	98	56

Như được trình bày trên bảng 25 ở trên, có thể thấy rằng OA-5D5, kháng thể kháng c-Met được sử dụng làm nhóm đối chứng, hầu như không được nội hóa vào các tế bào, trong khi kháng thể hu8C4 của sáng chế được nội hóa khoảng 40% trở lên vào các tế bào trong dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45. Kết quả cho thấy rằng kháng thể hu8C4 làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của thụ thể c-Met.

Sau đó, thử nghiệm đo mức thụ thể trên dòng tế bào ung thư phổi NCI-H820 đã được thực hiện để xác định hiệu quả làm giảm mức thụ thể bằng kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết đồng thời với thụ thể c-Met và thụ thể EGFR. Dòng tế bào NCI-H820 là dòng tế bào phù hợp để đo hiệu quả làm giảm mức thụ thể bằng kháng thể đặc hiệu kép kháng c-Met x EGFR, bởi vì thụ thể c-Met được biểu hiện ở mức khoảng 83.000 khả năng gắn kháng thể đặc hiệu (SABC) và thụ thể EGFR được biểu hiện ở mức khoảng 74.000 SABC.

Trước hết, các dòng tế bào NCI-H820 được chia với mật độ $1,0 \times 10^5$ vào mỗi giếng của đĩa 6 giếng với môi trường RPMI-1640 (2 ml) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó đĩa được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, RH 95% và 5% CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, môi

trường được thay thế bằng môi trường không có huyết thanh, sau đó đĩa thu được này được nuôi qua đêm ở điều kiện 37°C, RH 95% và 5% CO² trong 24 giờ. Sau đó, kháng thể kháng c-Met, kháng thể đặc hiệu kép kháng c-Met x EGFR, kháng thể kháng EGFR và kháng thể IgG ở người làm nhóm đối chứng, được phân tích, được pha loãng và xử lý trong môi trường có chứa 2% - FBS để đạt nồng độ cuối cùng là 10 nM, sau đó kháng thể thu được này được nuôi cấy trong 5 ngày. Tiếp đó, các tế bào của mỗi giếng được thu thập với 1 ml dung dịch đệm phân tách tế bào không có enzym, rồi các tế bào thu thập được này được rửa hai lần bằng PBS lạnh. Sau đó, IgG-CSF kháng chuột F(ab')₂ của dê (R&D Systems Cat. #F0103B) đã được thêm 10 µl vào mỗi giếng cũng làm kháng thể thứ cấp, tiếp đó đó được để phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, tế bào được rửa hai lần bằng PBS, sau đó tế bào thu được này được cố định bằng 100 µl BD Cytotfix (BD, #554655) và được rửa một lần bằng PBS, sao cho giá trị trung bình nhân FITC (MFI), một mức độ nhuộm huỳnh quang, được đo bằng cách sử dụng máy phân tích tế bào như mô BD FACS Canto II.

Kết quả là, khi xử lý kháng thể kháng c-Met hu8C4, thụ thể EGFR hầu như không giảm, nhưng thụ thể c-Met đã giảm đáng kể xuống mức 2% (Fig.10). Ngoài ra, kháng thể Vectibix kháng EGFR đã làm giảm thụ thể EGFR xuống mức khoảng 83%, nhưng thụ thể c-Met hầu như không giảm. Ngược lại, trong trường hợp xử lý kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix của sáng chế đồng thời gắn với thụ thể c-Met và EGFR, có thể xác định được rằng thụ thể EGFR đã giảm xuống mức khoảng 21% và thụ thể c-Met giảm xuống mức tương ứng khoảng 4%.

Do đó, có thể xác định được rằng kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix của sáng chế đã đồng thời làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của các thụ thể c-Met và EGFR.

Ví dụ 12. Xác định hoạt tính ức chế tín hiệu in vitro c-Met và EGFR của kháng thể đặc hiệu kép

Tiếp theo, thí nghiệm sử dụng dòng tế bào NCI-H820 đã được thực hiện để xác định ảnh hưởng của kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế đối với hoạt tính của kháng nguyên và vật liệu truyền tín hiệu.

Trước hết, các dòng tế bào NCI-H820 được chia vào đĩa 6 giếng với mật độ 0×10^5 tế bào mỗi giếng, sau đó đĩa thu được này được nuôi qua đêm trong điều kiện 37°C,

5% CO₂, tiếp đó môi trường được thay thế bằng môi trường không có huyết thanh và được nuôi cấy qua đêm một lần nữa. Kháng thể được pha loãng và xử lý trong môi trường không có huyết thanh ở nồng độ 100 nM, sau đó kháng thể thu được này được để phản ứng trong 24 giờ, để HGF (Gibco, PHG0254) và EGF (R&D System, 236-EG-200) được xử lý ở nồng độ 50 ng/ml và 10 ng/ml tương ứng 15 phút trước khi thu thập tế bào. Sau đó, các tế bào được hòa vào đệm hòa tan để thực hiện thu thập tế bào, sau đó nồng độ protein được định lượng bằng phương pháp xét nghiệm Lowry. 20 µg protein đã được nạp vào từng giếng và chạy trong SDS-PAGE, sau đó phân tích chuyển protein được thực hiện trên màng nitrocellulose. Sau khi phong tỏa màng, tất cả các kháng thể sơ cấp đã được pha loãng và phản ứng với tỷ lệ 1: 1.000, sau đó kháng thể kháng thể gắn HRP được pha loãng theo tỷ lệ 1: 5.000 và phản ứng dưới dạng các tế bào thứ cấp. Sau đó, các kháng thể được hấp thụ trên màng được phản ứng với chất phát quang hóa tăng cường (ECL), sau đó các kháng thể thu được này được đo bằng cách sử dụng thiết bị LC-3000.

Kết quả là, như được minh họa trên Fig.11, khi xử lý kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix scFv, sự phosphoryl hóa EGFR, sự phosphoryl hóa Erk và sự phosphoryl Akt đã giảm đáng kể so với chỉ xử lý bằng kháng thể hu8C4 hoặc Vectibix.

Do đó, kháng thể đặc hiệu kép hu8C4 x Vectibix scFv của sáng chế có thể làm giảm hoạt tính của thụ thể như EGFR, Erk, Akt, v.v., và các chất dẫn truyền tín hiệu tiếp đó ở dòng tế bào NCI-H820. Kết quả cho thấy kháng thể của sáng chế thể hiện hiệu quả thông qua ức chế quá trình truyền tín hiệu.

Ví dụ 13. Xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong mô hình chuột ghép ngoại lai U-87 MG

Thí nghiệm đã được thực hiện bằng cách sử dụng hu8C4 IgG2 x Vectibix scFv để xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bằng kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế trong mô hình ghép ngoại lai tế bào U-87 MG phụ thuộc HGF.

Trước hết, các dòng tế bào u nguyên bào đệm U-87 MG ở người được nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ bằng cách sử dụng môi trường EMEM (ATCC® 30-2003 TM) có chứa L-glutamin (300 mg/l), 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 10% FBS bất hoạt nhiệt và thành phần tương tự khác. Sau đó, các tế bào U-87 MG được tiêm dưới da 200µl vào sườn của chuột trụi lông đực 6 đến 8 tuần tuổi (Harlan) với nồng độ 1×10^7 cho

mỗi con chuột. Sau khi xác định rằng thể tích khối u hình thành trong 25 ngày sau khi tiêm đạt 60 - 130 mm³, một nhóm đã được thí nghiệm, sau đó một vật liệu xét nghiệm được tiêm trong màng bụng mỗi tuần một lần trong 4 tuần (tổng cộng 5 lần: vào các ngày 0, 7, 14, 21 và 28). Vật liệu thử nghiệm được dùng 5 mg/kg, thể tích khối u và trọng lượng chuột được đo hai lần một tuần. Đối với dữ liệu, so sánh giữa nhóm đối chứng tá dược và nhóm sử dụng vật liệu thử nghiệm thường được xác định bằng cách sử dụng hàm kiểm tra Student t-test, và phương pháp thống kê được sử dụng là chương trình Origin Pro 8.5. “% ức chế tối đa” cho thấy % ức chế tăng trưởng khối u so với nhóm đối chứng được điều trị bằng dung môi.

Kết quả là, nhóm sử dụng 3,5 mg/kg và 6,8 mg/kg hu8C4 IgG2 x Vectibix scFv có sự ức chế tối đa 96% đối với thể tích khối u so với nhóm đối chứng sử dụng dung môi và nhóm dùng 1,5 mg/kg ức chế tối đa 80%, do đó giảm thể tích khối u xuống mức đáng kể từ ngày thứ 7 sau khi dùng thuốc cho đến ngày cuối cùng của thử nghiệm ($p < 0,01$) (Fig.12). Ngoài ra, khi so sánh với BsAB-01 là nhóm đối chứng dương, kháng thể đặc hiệu của sáng chế đã làm giảm sự phát triển khối u xuống mức thấp đáng kể ($p < 0,01$).

Do đó, kết quả trên đây có thể khẳng định rằng kháng thể đặc hiệu kép của sáng chế làm giảm đáng kể sự phát triển của khối u, do đó có hiệu quả chống ung thư tốt.

Ví dụ 14. Xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H820

Dòng tế bào NCI-H820, là dòng tế bào có threonin (T) của axit amin EGFR số 790 bị đột biến thành methionin (M) và có gen MET được khuếch đại, được gọi là dòng tế bào kháng AZD9291 (osimertinib, tagrisso), là EGFR TKI thế hệ thứ ba (Darren A. E. Cross, và cộng sự, Ung thư Discov. 4(9): 1046-1061 (2014)). Đánh giá đã được thực hiện trên mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H820 bằng cách sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv một ngoài kháng thể đặc hiệu của sáng chế, để xem hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u của kháng thể đặc hiệu kép trong dòng tế bào NCI-H20 kháng EGFR TKI.

Cụ thể, chuột được sử dụng trong ví dụ này là chuột đực 6 tuần tuổi (Jackson Laboratory, STOCK Hgftm1.1 (HGF) Aveo Prkdcscid/J), trong đó gen HGF của chuột đã được loại bỏ và biến đổi để biểu hiện gen HGF của người. Dòng tế bào NCI-H820 (ATCC, #HTB-181) được đưa vào bình để nuôi cấy tế bào cùng với môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS, sau đó bình thu được này được nuôi cấy ở điều kiện 37°C,

5% CO₂. Sau đó, các tế bào thu được này được rửa bằng PBS và 2,5% trypsin-EDTA (Gibco, 15090) được pha loãng 10 lần, sau tế bào được tách. Sau đó, công đoạn ly tâm (1.000 vòng/phút, 5 phút) đã được thực hiện để loại bỏ dịch nổi trên bề mặt và thu được huyền phù tế bào trong môi trường mới. Sau đó, khả năng tồn tại của tế bào được xác định bằng kính hiển vi, sau đó các tế bào thu được này được pha loãng trong môi trường không có huyết thanh với nồng độ $5,0 \times 10^7$ tế bào/ml, do đó tạo ra các dòng tế bào. Các dòng tế bào được tạo ra được tiêm dưới da vào chuột với lượng 0,1 ml/con. Sau khi tiêm, khi kích thước khối u ở một vùng có các dòng tế bào được cấy vào đó đạt khoảng 100 - 150 mm³, các dòng tế bào được phân phối sao cho kích thước khối u của mỗi nhóm có thể được phân tán đều theo kích thước khối u được xếp hạng. Sau đó, sự phát sinh ung thư được xác định hai lần một tuần kể từ ngày thứ 7 sau khi bắt đầu tiêm tế bào cho đến ngày thứ 28 sau một ngày chia nhóm (ngày bắt đầu tiêm vật liệu xét nghiệm) và sau khi dùng tiêm vật liệu xét nghiệm, sau đó là trục chính của khối u và trục phụ được đo bằng thước cặp, qua đó tính toán kích thước khối u ($ab^2/2$ (a: chiều dài trục chính, b: chiều dài trục phụ)). Phân tích thống kê được thực hiện bởi Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Nếu giá trị p nhỏ hơn 0,05, sự khác biệt được đánh giá là có ý nghĩa thống kê.

Trong tất cả các nhóm được điều trị bằng hu8C4 x Vectibix scFv từ ngày thứ 4 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử cho đến ngày thứ 28, kết quả cho thấy rằng hoạt tính ức chế sự tăng sinh khối u cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng sử dụng dung môi (p < 0,001), và cũng đã xác định được rằng tỷ lệ ức chế khối u lên tới tối đa 100% (Fig.13). Mặt khác, AZD9291 (Selleckchem), được sử dụng làm nhóm đối chứng dương, không cho thấy sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng sử dụng dung môi.

Ví dụ 15. Xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong ống nghiệm bằng cách sử dụng kết hợp kháng thể 5G3 c-Met và kháng thể HER2

Thử nghiệm *in vitro* về hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào đã được thực hiện bởi dòng tế bào NCI-H2170, để đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bởi tổ hợp của kháng thể kháng c-Met 5G3 của sáng chế và kháng thể kháng HER2. Dòng tế bào NCI-H2170 (ATCC #CRL-5928) là dòng tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), trong đó, theo kết quả đo mức thụ thể của nó, EGFR đã được biểu hiện

ở mức khoảng 2.700 SABC, trong khi c-Met được biểu hiện ở mức khoảng 11.000 SABC.

Cụ thể, các tế bào NCI-H2170 đã được pha loãng trong môi trường nuôi cấy RPMI-1640 chứa 10% (v/v) FBS, sau đó các tế bào thu được này được thêm 100 μ l vào đĩa ở mật độ $3,0 \times 10^3$ mỗi giếng, sau đó đĩa được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, RH 95% và 5% CO₂ trong 18 - 24 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy tế bào của mỗi giếng được loại bỏ, rồi môi trường RPMI-1640 chứa 2% (v/v) FBS được bổ 100 μ l vào mỗi giếng. Sau đó, các kháng thể được pha chế với nồng độ cuối cùng 2X (100 nM) liên tục được pha loãng với tỷ lệ 1/10, sao cho các kháng thể thu được này được thêm 100 μ l vào mỗi giếng ở sáu nồng độ (cụ thể là 200 nM, 20 nM, 2 nM, 200 pM, 20 pM và 2 pM) cho mỗi kháng thể. Đĩa được nuôi cấy trong 5 ngày ở 37°C, RH 95% và 5% (v/v) CO₂, sau đó 20 μ l dung dịch WST-8 (CKK-8, Dojindo) được thêm vào từng giếng vào ngày cuối cùng để thực hiện phát triển màu trong 1 - 2 giờ, để mật độ quang được đo ở bước sóng 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa vi thể.

Kết quả hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào được trình bày trên Bảng 26 và Fig.14.

Bảng 26. Hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u *in vitro* bởi liệu pháp kết hợp của kháng thể kháng c-Met và kháng thể kháng HER2

Kháng thể	Xét nghiệm ức chế sự tăng sinh tế bào, IC ₅₀ (nM)	
	NCI-H2170 (NSCLC)	
	Không có HGF	HGF 50 ng/ml
A091-F1	> 100	> 100
5G3	> 100	> 100
A091-F1 + 5G3 kết hợp	> 100	11,22

Như được trình bày trên Bảng 26, có thể xác định được rằng việc xử lý kết hợp kháng thể 5G3 và A091 (Đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-1515535) là kháng thể kháng HER2 có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u tốt hơn so với xử lý độc lập mỗi kháng thể ở dòng tế bào khối u NCI-H2170.

Ví dụ 16. Xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u in vivo bằng cách sử dụng kết hợp kháng thể c-Met 5G3 và kháng thể HER2 trong mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H2170 chứa dòng tế bào ung thư phổi ở người

Thử nghiệm hoạt tính chống ung thư đã được thực hiện trên mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H2170 chứa dòng tế bào ung thư phổi, để thấy hiệu quả kết hợp giữa kháng thể HER2 và kháng thể c-Met.

Cụ thể là, trong ví dụ này, kích thước khối u của chuột được đo bằng phương pháp giống như trong Ví dụ 14 bằng cách sử dụng chuột giống như trong Ví dụ 13 ở trên. Kết quả đánh giá hiệu quả chống ung thư bằng sự kết hợp A091 và 5G3 trong mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H2170 chứa tế bào ung thư phổi được thể hiện trên Fig.15.

Kết quả là, trong trường hợp chỉ sử dụng A091 hoặc sử dụng A091 kết hợp với 5G3, khối lượng khối u đã giảm xuống thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng sử dụng dung môi từ ngày thứ 14 sau khi sử dụng ($p < 0,05$). Ngoài ra, nhóm được sử dụng kết hợp A091 và 5G3 cho thấy khối lượng khối u giảm đáng kể so với nhóm chỉ sử dụng A091 hoặc nhóm chỉ sử dụng BsAB02 (US2010/0254988 A1) làm kháng thể đặc hiệu kép đối chứng ($p < 0,01$).

Ví dụ 17. Xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H596

Dòng tế bào NCI-H596 là dòng tế bào ung thư phổi có đột biến ở exon 14 của c-Met, một đánh giá đã được thực hiện trên mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H596, để xác định hiệu quả chống ung thư của hu8C4 x Vectibix scFv.

Trong ví dụ này, kích thước khối u của chuột được đo bằng cách sử dụng cùng loại chuột và cùng phương pháp như trong Ví dụ 14 ở trên.

Kết quả đánh giá hiệu quả chống ung thư sau khi sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv một hoặc hai lần một tuần trong tổng số 4 tuần trong mô hình chuột ghép ngoại lai NCI-H596 có chứa tế bào khối u phổi được minh họa trên Fig.16.

Kết quả đo kích thước khối u cho thấy rằng, mức kích thước khối u trong một nhóm được sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv 10 mg/kg hai lần một tuần cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng từ ngày thứ 11 sau khi bắt đầu vật liệu thử nghiệm cho đến khi kết thúc thí nghiệm, và mức kích thước khối u trong nhóm dùng

hu8C4 x Vectibix scFv 5 mg/kg hai lần một tuần cũng như nhóm dùng hu8C4 x Vectibix scFv 10 mg/kg mỗi lần một tuần cũng thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng từ ngày thứ 18 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử nghiệm. Ngoài ra, mức kích thước khối u trong nhóm dùng vật liệu thử nghiệm có xu hướng thay đổi tương quan với liều vật liệu thử nghiệm, và kích thước khối u của nhóm thử nghiệm thấp hơn so với nhóm đối chứng ngay cả sau khi ngày cuối cùng sử dụng vật liệu thử nghiệm (ngày 28).

Ví dụ 18. Xác định hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào khối u trong mô hình chuột ghép ngoại lai EBC-1

EBC-1 là dòng tế bào ung thư phổi có gen c-Met được khuếch đại, đánh giá đã được thực hiện trên mô hình chuột ghép ngoại lai EBC-1, để xác định hiệu quả chống ung thư của hu8C4 x Vectibix scFv.

Chuột được sử dụng trong ví dụ này là chuột trụi lông cái sáu tuần tuổi (Harlan). Các dòng tế bào EBC-1 (JCRB, #JCRB0820) được đưa vào bình để nuôi cấy tế bào cùng với môi trường EMEM chứa 10% FBS, sau đó các dòng tế bào thu được này được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Các dòng tế bào được chuẩn bị để dòng tế bào thu được này được pha loãng trong môi trường không có huyết thanh với mật độ $5,0 \times 10^7$ tế bào/ml, sau đó các dòng tế bào được tiêm dưới da vào chuột với lượng 0,1 ml /con chuột. Khi kích thước khối u trong một khu vực có các dòng tế bào được cấy vào đó đạt khoảng 100 - 150 mm³, hu8C4 x Vectibix scFv được tiêm một hoặc hai lần một tuần trong tổng số 4 tuần, sau đó kích thước khối u của chuột được đo bằng phương pháp giống như trong Ví dụ 14.

Kết quả đánh giá hiệu quả chống ung thư bằng hu8C4 x Vectibix scFv trong mô hình chuột ghép ngoại lai EBC-1 chứa tế bào ung thư phổi được minh họa trên Fig.17.

Kết quả đo kích thước khối u cho thấy rằng, mức kích thước khối u trong một nhóm được sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv 10 mg/kg hai lần một tuần cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng từ ngày thứ 7 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử nghiệm cho đến ngày thứ 56 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử nghiệm. Nhóm sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv 5 mg/kg hai lần một tuần và nhóm sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv 5 mg/kg một lần một tuần cho thấy mức độ thấp đáng kể so với nhóm đối chứng từ ngày thứ 18 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử nghiệm. Ngoài ra, mức kích thước khối u trong một nhóm dùng vật liệu thử nghiệm có xu hướng thay đổi tương

quan với liều vật liệu thử nghiệm, và mức kích thước khối u trong nhóm sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv 10 mg/kg hai lần một tuần trong thời gian quan sát sau ngày cuối cùng (Ngày 28) sử dụng vật liệu thử nghiệm thấp đáng kể so với nhóm đối chứng cho đến ngày thứ 56 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử nghiệm. Cụ thể là, kết quả cho thấy rằng một cá thể trong nhóm được sử dụng hu8C4 x Vectibix scFv 10 mg/kg hai lần một tuần đã có đáp ứng hoàn toàn vào ngày thứ 18 sau khi bắt đầu sử dụng vật liệu thử nghiệm.

Ví dụ 19. Hiệu quả làm giảm c-Met và EGFR trên bề mặt tế bào ung thư bằng kháng thể đặc hiệu kép

Hiệu quả làm giảm c-Met và EGFR trên bề mặt tế bào khối u *in vitro* bằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv) của sáng chế đã được xác định và so sánh với hiệu quả của kháng thể c-Met (hu8C4) của sáng chế, tổ hợp vectibix, c-Met/EGFR và các kháng thể khác.

Thụ thể thường nằm trên màng tế bào được nội hóa vào tế bào khi gắn với kháng thể, do đó số lượng của chúng nằm trên màng tế bào được làm giảm. Sự suy giảm thụ thể trên màng tế bào gây ra sự ức chế hoạt hóa thụ thể và suy giảm tín hiệu kế tiếp sau đó bởi liên kết phối tử.

Trong ví dụ này, dòng tế bào ung thư tuyến phổi HCC827 đã được sử dụng để quan sát sự suy giảm c-Met và EGFR trên màng tế bào. HCC827 có đột biến mất đoạn EGFR E746-A750 và biểu hiện quá mức c-Met. HCC827 đã được xử lý bằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv) của sáng chế và các kháng thể khác, sau đó nhuộm màu miễn dịch huỳnh quang được thực hiện bởi kháng thể đặc hiệu với c-Met và EGFR, để dòng tế bào thu được này được phân tích bằng phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang, nhờ đó đo lường c-Met và EGFR trên bề mặt tế bào. Phương pháp chi tiết như sau.

Trước hết, các tế bào HCC827 (ATCC® CRL-2868 TM) được chia với mật độ $3,0 \times 10^5$ vào mỗi giếng của đĩa 6 giếng chứa môi trường RPMI-1640 (2 ml) chứa 10% (v/v) FBS, sau đó đĩa được nuôi cấy ở 37°C, RH 95% và 5% CO₂ trong 24 giờ. Kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv) của sáng chế, kháng thể c-Met (hu8C4) của sáng chế, vectibix, hỗn hợp kháng thể c-Met (hu8C4) của sáng chế và vectibix, C-EM1 và LA480 đã được pha loãng để đạt nồng độ cuối cùng là 100 nM, sau đó các kháng thể thu được

này được xử lý và được để phản ứng trong 18 giờ. Đã được sử dụng làm nhóm đối chứng không giảm với c-Met và EGFR, kháng thể IgG ở người đã được xử lý và được để phản ứng trong 18 giờ. Sau đó, các tế bào của mỗi giếng được thu thập cùng với 500 μ l dung dịch đệm phân ly tế bào không có enzym (Gibco, #13151), sau đó các tế bào được tách ra khỏi đệm phân tách tế bào không có enzym bằng máy phân ly ly tâm, để loại bỏ đệm phân tách tế bào không enzym. Đối với nhuộm miễn dịch huỳnh quang, kháng thể c-Met có nguồn gốc từ dê (R&D system, AF276), kháng thể EGFR có nguồn gốc từ dê (R&D system, AF231), hoặc kháng thể không có nguồn gốc từ dê để đo mức độ nhuộm màu được trọng bởi 2 μ g tương ứng với 200 μ l PBS lạnh chứa 2% (v/v) FBS, sau đó các kháng thể thu được này được xử lý trong từng giếng, để đĩa thu được này được phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, đĩa thu được này được rửa hai lần bằng PBS lạnh chứa 2% (v/v) FBS. ALEXA488 được gắn làm kháng thể thứ cấp, sau đó 1 μ l kháng thể có nguồn gốc từ lừa (Thermo Fisher, A-11055) gắn với kháng thể dê đã được pha loãng với 200 μ l PBS lạnh chứa 2% (v/v) FBS, tiếp đó kháng thể thu được này được sử dụng. Sau khi được phản ứng với kháng thể thứ cấp ở 4°C trong 1 giờ, các tế bào thu được này được rửa hai lần bằng PBS lạnh chứa 2% (v/v) FBS, sau đó các tế bào thu được đã được cố định bằng cách sử dụng 200 μ l BD Cytfix (BD, #554655). Sau khi được rửa một lần bằng PBS, giá trị mật độ huỳnh quang trung bình nhân (geo MFI) ALEXA488, mức độ nhuộm huỳnh quang, được đo bằng cách sử dụng bộ phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang BD FACS Canto II. Lượng c-Met và EGFR nằm trên màng tế bào được biểu thị là mật độ huỳnh quang trung bình nhân (geo MFI) theo công thức sau. Đối với các giá trị thu được sau khi thực hiện thử nghiệm lặp lại ba lần, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được trình bày trên Bảng 27 và Fig.18 và 19.

$$\text{Số lượng c-Met hoặc EGFR trên bề mặt} = \text{geo MFI}_{[\text{nhóm thử nghiệm}]} - \text{geo MFI}_{[\text{kháng thể có nguồn gốc từ dê không đặc hiệu}]}$$

Bảng 27. Lượng c-Met và EGFR trên bề mặt tế bào đo được sau khi xử lý dòng tế bào HCC827 bằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv)

Kháng thể được xử lý	c-Met		EGFR	
	Trung bình (geo MFI)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (geo MFI)	Độ lệch chuẩn

human IgG	5653	1032	11494	3276
hu8C4	3436	892	11593	3448
Vectibix	5653	1309	10326	3256
hu8C4 + Vectibix kết hợp	3551	1047	10111	2932
hu8C4 x Vectibix scFv	1689	321	9930	3305
C-EM1	3665	878	11503	3715
C-LA480	3267	764	11655	4156

Như được trình bày trên Bảng 27 ở trên, tất cả các kháng thể gắn với c-Met đều làm giảm c-Met trên bề mặt tế bào khoảng 40~70%, trong khi các kháng thể gắn với EGFR cho thấy hiệu quả giảm không đáng kể, khoảng 10-15%. Tiếp tục xem xét hiệu quả làm giảm c-Met, hu8C4, tổ hợp của hu8C4 + Vectibix, C-EM1 và C-LA480 đã làm giảm c-Met trên bề mặt tế bào khoảng 40% trở lên, trong khi hu8C4 x Vectibix scFv làm giảm c-Met trên bề mặt tế bào 70%, do đó thể hiện hiệu quả làm giảm c-Met trên bề mặt tế bào tốt hơn so với các kháng thể khác và tổ hợp của các kháng thể.

Kết quả ở trên cho thấy rằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv) của sáng chế làm giảm đáng kể lượng c-Met trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 20. Lập bản đồ epitop

Để tìm ra epitop của kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv) của sáng chế về kháng nguyên c-Met ở người, việc phân tích đã được giao cho nhóm hỗ trợ thiết kế mô hình phân tử của Quỹ đổi mới y tế Osong (KBIO, Hàn Quốc). Phân tích được thực hiện bằng phương pháp khối phổ trao đổi hydro-đơteri (HDX-MS).

Miền sema c-Met bao gồm hai chuỗi α/β , do đó xác định từng vùng tác dụng cho hai chuỗi. Do sự hiện diện của một số liên kết disulfua trong mẫu, vùng tác dụng peptit được tối ưu hóa bằng cách điều chỉnh thời gian giữ dập tắt, nồng độ TCEP, nồng độ pepsin, v.v.. Cuối cùng, thí nghiệm đã được thực hiện trong điều kiện đệm dập tắt với 100 mM kali phosphat, 125 mM TCEP, 0,5 M Guanidin-HCl và pH 2,66.

Kháng nguyên và kháng thể được chuẩn bị ở nồng độ lần lượt là 3,3 mg/ml và 65 mg/ml, và 37 pmol kháng nguyên cMET và 36 pmol kháng thể được gắn 3 giờ trước thí

nghiệm. Đệm đánh dấu đơteri đã được phản ứng trong 0, 0,33, 10, 60 và 240 phút. Việc đánh dấu được dừng lại bằng đệm dập tắt theo từng thời gian đánh dấu và quá trình tạo xoáy được thực hiện, sau đó chúng được đông lạnh ngay lập tức trong nitơ lỏng, do đó được lưu trữ ở -80°C trước khi phân tích. Các kháng nguyên và kháng thể thu được này được nạp vào cột pepsin và được phân tích bằng máy khối phổ (MS).

Theo kết quả phân tích, có thể xác định được rằng kháng thể đặc hiệu kép (hu8C4 x Vectibix scFv) của sáng chế gắn với dạng epitop 3 chiều ở 4 vùng gồm Y321 - L329 (SEQ. NO. 331), I333 - I341 (SEQ. NO. 332), P366 - D372 (SEQ. NO. 333) và Q464 - S474 (SEQ. NO. 334) của chuỗi β miền sema c-Met của người (Bảng 28). Việc đánh dấu được thực hiện trên cấu trúc cấp ba của kháng nguyên c-Met người (PDB số 4K3J) bằng cách sử dụng chương trình PyMOL, trong đó kết quả được minh họa trên Fig.20.

Bảng 28. Trình tự axit amin của vùng quyết định kháng nguyên

Vùng quyết định kháng nguyên	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Y321-L329	YVSKPGAQL	331
I333-I341	IGASLNDDI	332
P366-D372	PIKYVND	333
Q464-S474	QYYYSRSGPST	334

Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng kháng thể chuột, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể được tối ưu hóa hoặc hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo sáng chế, gắn đặc hiệu với c-Met, hoạt động có chọn lọc trên c-Met, trong đó chúng thể hiện hoạt tính ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư tốt cũng như hoạt tính chống ung thư tốt ngay cả với một lượng nhỏ, do đó có phòng hoặc điều trị ung thư một cách có hiệu quả.

Mặc dù các phần cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết ở trên, nhưng những người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rõ rằng các phần mô tả chi tiết trên đây chỉ nhằm mục đích minh họa các phương án thực hiện mẫu mà không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế chỉ được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), trong đó kháng thể này là:

(a) kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 2; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 8; và CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9;

(b) kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 4; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 5; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 10; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 11; và CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 12; hoặc

(c) các kháng thể được tối ưu hóa ái lực của chúng.

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 13 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 15; hoặc (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 16.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23;

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 22 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 24;

(c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 31; hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 32.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể bao gồm vùng bản lề là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37 đến SEQ ID NO: 44.

5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể được tối ưu hóa ái lực là kháng thể, trong đó ít nhất một trình tự axit amin được thay thế từ kháng thể, bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID No: 1; CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID No: 2; CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID No: 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID No: 7; CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID No: 8; và CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID No: 9; và trong đó

(i) G ở vị trí thứ nhất của CDR1 của chuỗi nhẹ được thay thế bởi A, E, K, L, N, R, S, V hoặc W; A ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi C, G, I, P, S, T hoặc V; S ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi G, M, N, P, Q, R, S hoặc T; E ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi A, D, F, G, H, K, M, Q, R, S, T hoặc V; N ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi A, D, E, G, K, L, P, Q, R, S, T hoặc V; I ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi A, F, L, M, Q, R, S, T hoặc V; Y ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi F, H, R hoặc V; hoặc G ở vị trí thứ tám của nó được thay thế bởi D, F, H, M, N, R, S, T hoặc V;

(ii) G ở vị trí thứ nhất của CDR2 của chuỗi nhẹ được thay thế bởi D, F, H, K, P, Q, S, V hoặc Y; T ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi Q; hoặc N ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi G;

(iii) Q ở vị trí thứ nhất của CDR3 của chuỗi nhẹ được thay thế bởi E, G, I, M hoặc N; N ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi A, D, E, H, L, Q, S hoặc T; V ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi I, L, M, N, Q, S hoặc T; L ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi F, H, I, M, R, S, V, W hoặc Y; S ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi C, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, T, V hoặc Y; S ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, T, V hoặc Y; P ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi A, D, E, G, N, Q, S hoặc V; Y ở vị trí thứ tám của nó được thay thế bởi E, F, L, M hoặc Q; hoặc T ở vị trí thứ chín của nó được thay thế bởi D, F, G, I, L, N, S, V, W hoặc Y;

(iv) D ở vị trí thứ nhất của CDR1 của chuỗi nặng được thay thế bởi G hoặc Q; Y ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi Q; hoặc I ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi A hoặc Q;

(v) F ở vị trí thứ ba của CDR2 của chuỗi nặng được thay thế bởi D, E, W hoặc Y; G ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi D, H hoặc Y; S ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi F, P, W hoặc Y; G ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi A, F, L, N hoặc T; N ở vị trí thứ tám của nó được thay thế bởi F, P, S, T hoặc Y; T ở vị trí thứ chín của nó được thay thế bởi A, D, E, F, G, H, L, P, S hoặc V; H ở vị trí thứ mười của nó được thay thế bởi A, D, F, M, R, S, T, V, W hoặc Y; F ở vị trí thứ mười một của nó được thay thế bởi G, H, I, L, M, N, P, Q, V hoặc Y; S ở vị trí thứ mười hai của nó được thay thế bởi A, D, G, H, I, L, P, T hoặc V; A ở vị trí thứ mười ba của nó được thay thế bởi D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, T, V hoặc Y; R ở vị trí thứ mười bốn của nó được thay thế bởi A, E, G, H, L, N, P, Q, S, W hoặc Y; F ở vị trí thứ mười lăm của nó được thay thế bởi D, E, G, L, M, P, R, S, V hoặc W; K ở vị trí thứ mười sáu của nó được thay thế bởi A, E, F, G, H, L, R, S, T, V hoặc Y; hoặc G ở vị trí thứ mười bảy của nó được thay thế bởi E, F, H, L, M, N, P, Q, R, S, T, V hoặc W; hoặc

(vi) G ở vị trí thứ nhất của CDR3 của chuỗi nặng được thay thế bởi E, F, H, N, Q, V hoặc W; D ở vị trí thứ hai của nó được thay thế bởi E; Y ở vị trí thứ ba của nó được thay thế bởi L, Q, T hoặc V; G ở vị trí thứ tư của nó được thay thế bởi W; F ở vị trí thứ năm của nó được thay thế bởi L hoặc Y; L ở vị trí thứ sáu của nó được thay thế bởi Q, S hoặc Y; hoặc Y ở vị trí thứ bảy của nó được thay thế bởi C, L, M, N hoặc Q,

trong đó CDR1 của chuỗi nhẹ bao gồm 0-5 sự thay thế, CDR2 của chuỗi nhẹ bao gồm 0-1 sự thay thế, CDR3 của chuỗi nhẹ bao gồm 0-7 sự thay thế, CDR1 của chuỗi nặng bao gồm 0-1 sự thay thế, CDR2 của chuỗi nặng bao gồm 0-11 sự thay thế, và CDR3 của chuỗi nặng bao gồm 0-6 sự thay thế.

6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể được tối ưu hóa ái lực bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 229 đến SEQ ID NO: 268; CDR2 của chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 182 đến SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 227 và SEQ ID NO: 228; CDR3 của chuỗi

nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 142 đến SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 191 đến SEQ ID NO: 226 và SEQ ID NO: 269 đến SEQ ID NO: 301; và

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 108 đến SEQ ID NO: 112; CDR2 của chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 54 đến SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 72 đến SEQ ID NO: 107 và SEQ ID NO: 118 đến SEQ ID NO: 141; CDR3 của chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 71 và SEQ ID NO: 113 đến SEQ ID NO: 117.

7. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể được tối ưu hóa ái lực bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 306 đến SEQ ID NO: 311, và vùng biến đổi chuỗi nặng là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 302 đến SEQ ID NO: 305.

8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 7, trong đó kháng thể được tối ưu hóa ái lực bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 302;

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 305;

(c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 310 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23;

(d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 308 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 305;

(e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 306 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 303;

(f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 307 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304;

(g) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 308 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304;

(h) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 309 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304;

(i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 311 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 304; hoặc

(j) vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 306 và vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 302.

9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể còn gắn đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR).

10. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 9, trong đó kháng thể là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó gắn với EGFR được liên kết với một đầu chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu c-Met.

11. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 9, trong đó mảnh gắn kháng nguyên này gắn với EGFR là Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc Fv.

12. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 11, trong đó Fv là một hay nhiều mảnh scFv được chọn từ nhóm bao gồm Erbitux, Vectibix, Portrazza và TheraCIM.

13. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 12, trong đó Erbitux scFv bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 313 hoặc SEQ ID NO: 314.

14. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 12, trong đó Vectibix scFv bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 315.

15. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 10, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được liên kết với đoạn kết nối nêu trong SEQ ID NO: 312.

16. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kháng nguyên là Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc Fv.

17. Phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.

18. Vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 17.
19. Tế bào chủ có vector biểu hiện theo điểm 18 được đưa vào.
20. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, trong đó phương pháp này sử dụng tế bào chủ theo điểm 19.
21. Chế phẩm phát hiện c-Met, bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.
22. Kit để phát hiện c-Met, trong đó kit này bao gồm chế phẩm phát hiện c-Met theo điểm 21.
23. Phương pháp phát hiện kháng nguyên c-Met, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.
24. Chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị ung thư, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.
25. Chế phẩm theo điểm 24, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó này gắn với c-Met để ức chế hoạt tính thụ thể.
26. Chế phẩm theo điểm 25, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó này còn gắn với EGFR để ức chế hoạt tính thụ thể.
27. Chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị ung thư gây ra bởi sự biểu hiện quá mức, khuếch đại, đột biến hoặc hoạt hóa c-Met, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.
28. Chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị ung thư được chọn từ nhóm bao gồm: ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC), u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư tuyến tụy, ung thư đầu và cổ, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư não, ung thư tử cung, u lạc nội mạc tử cung, ung thư tuyến giáp, bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy, bệnh bạch cầu mạn tính dòng tủy, u tủy, đa u tủy, ung thư tế bào hắc tố, ung thư hạch bạch huyết và ung thư biểu mô vò thượng thận, trong đó chế

phẩm này bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.

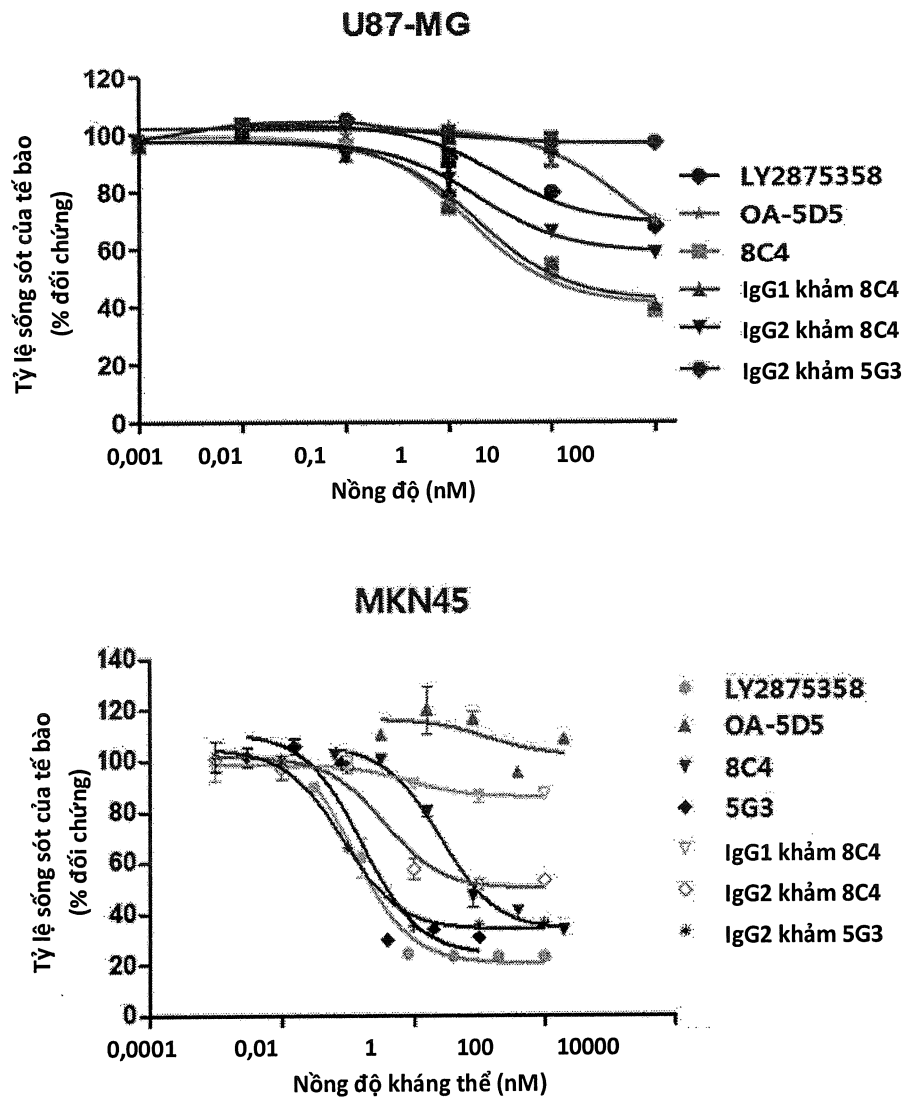


Fig.1

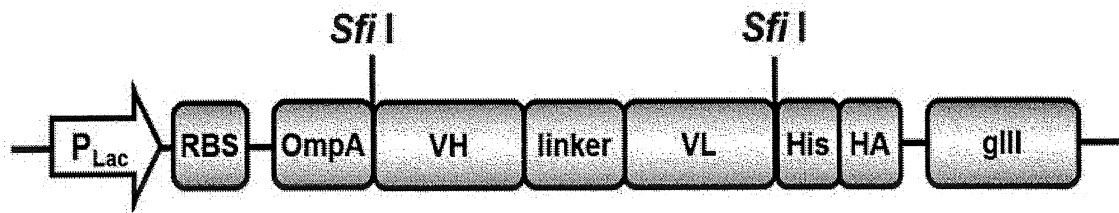


Fig.2

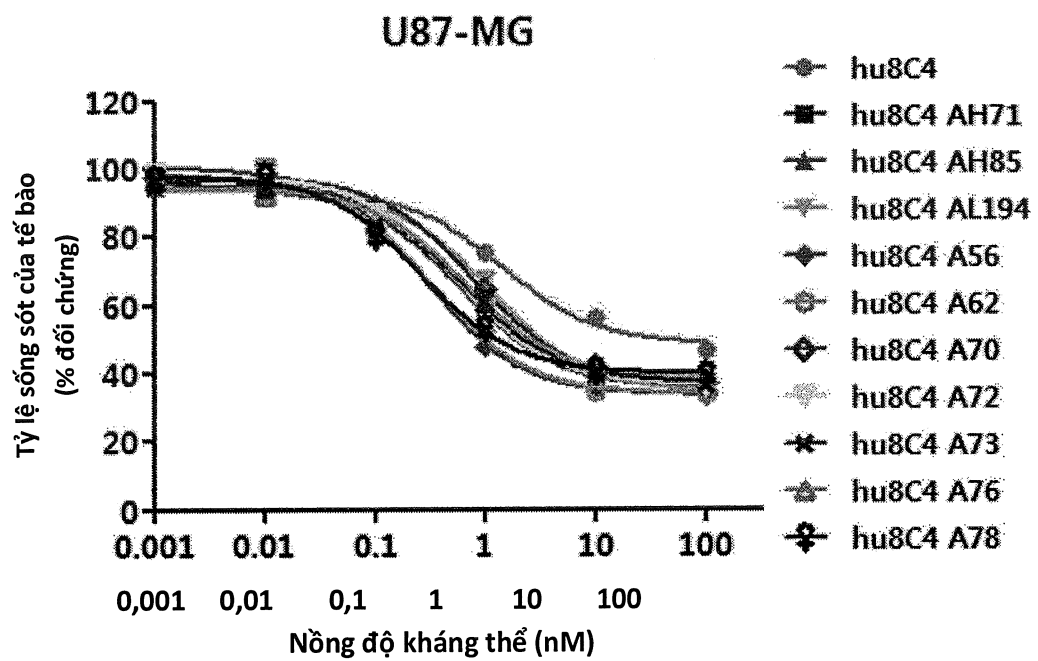


Fig.3

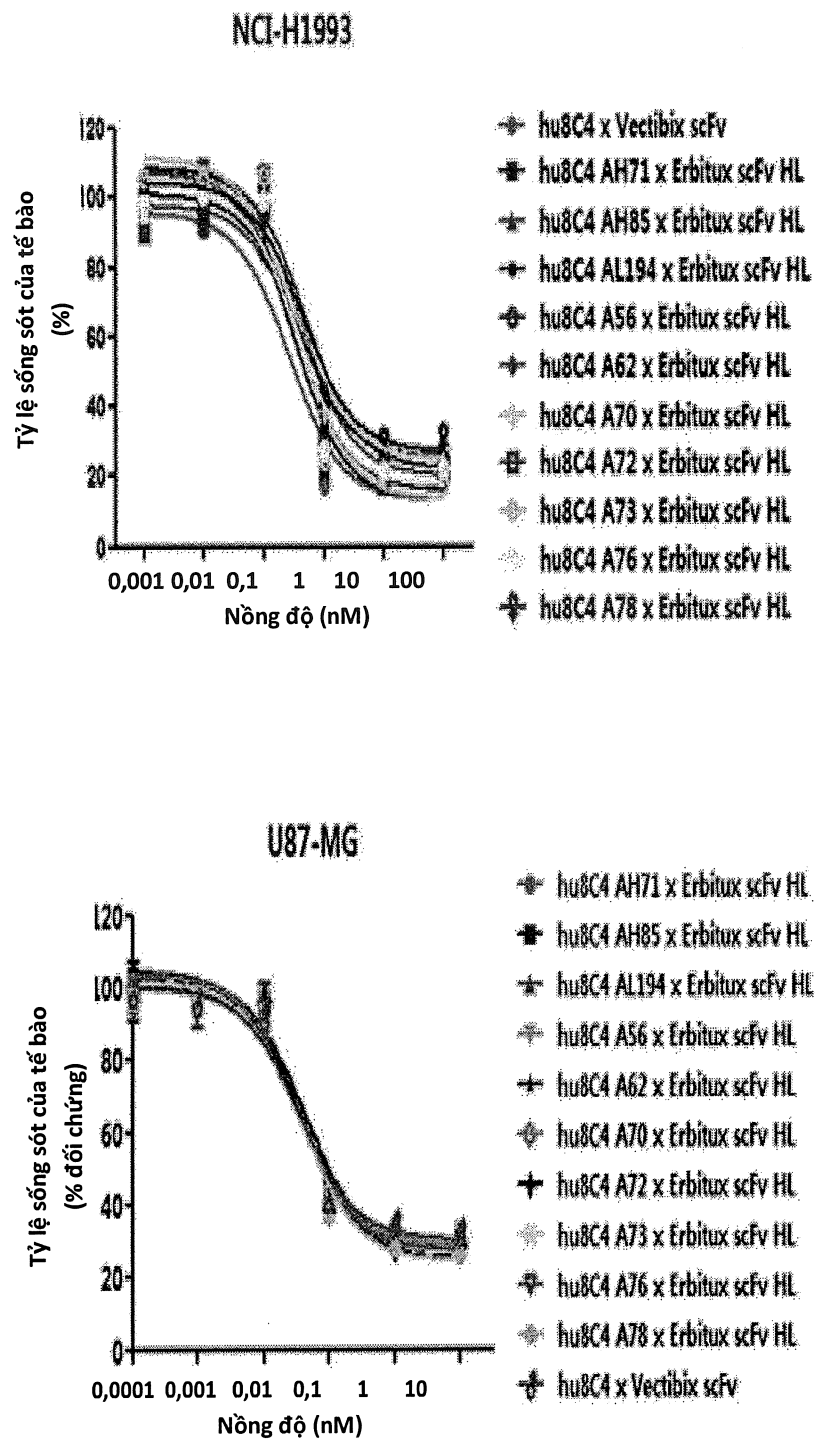


Fig.4

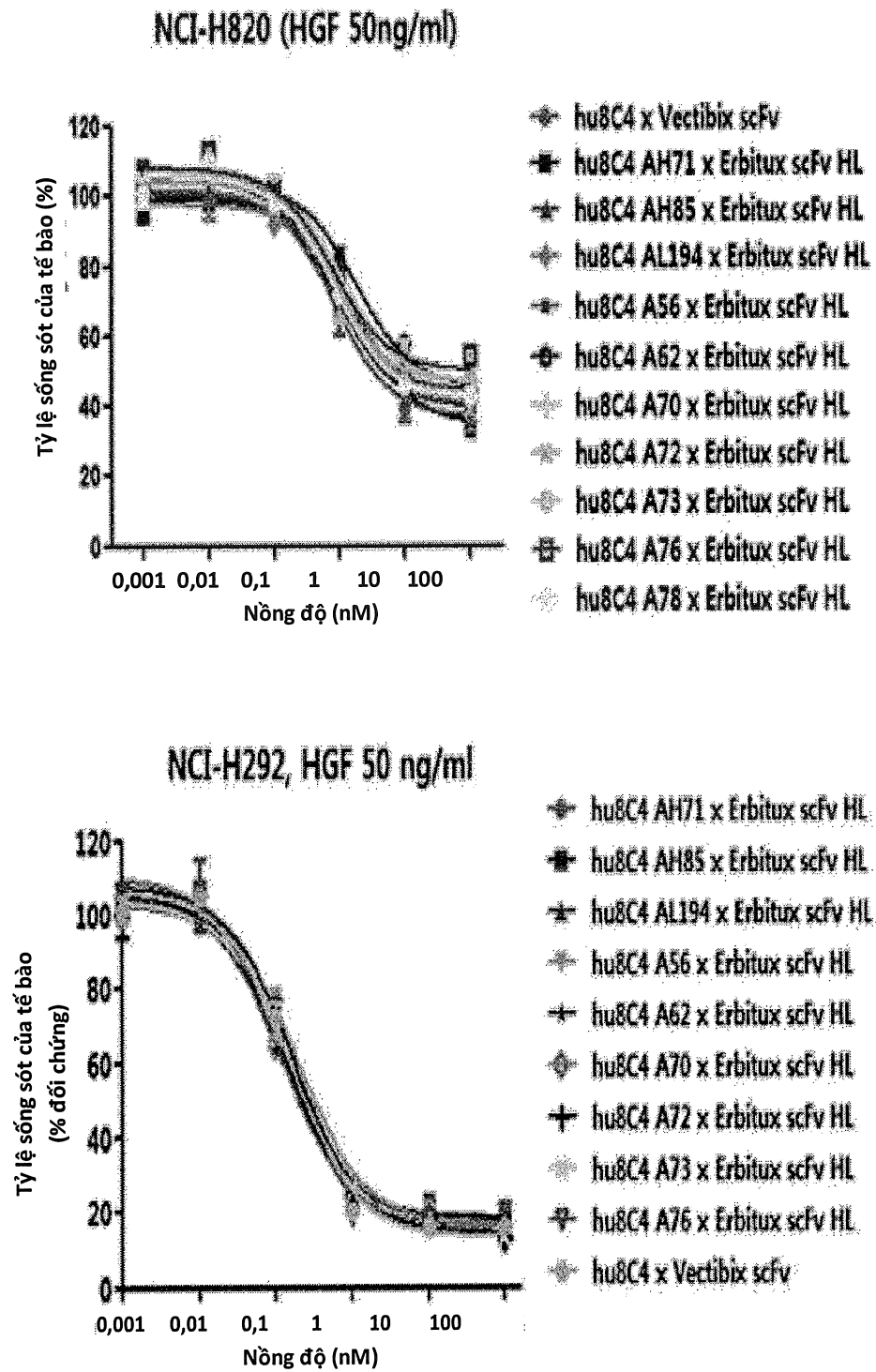


Fig.5

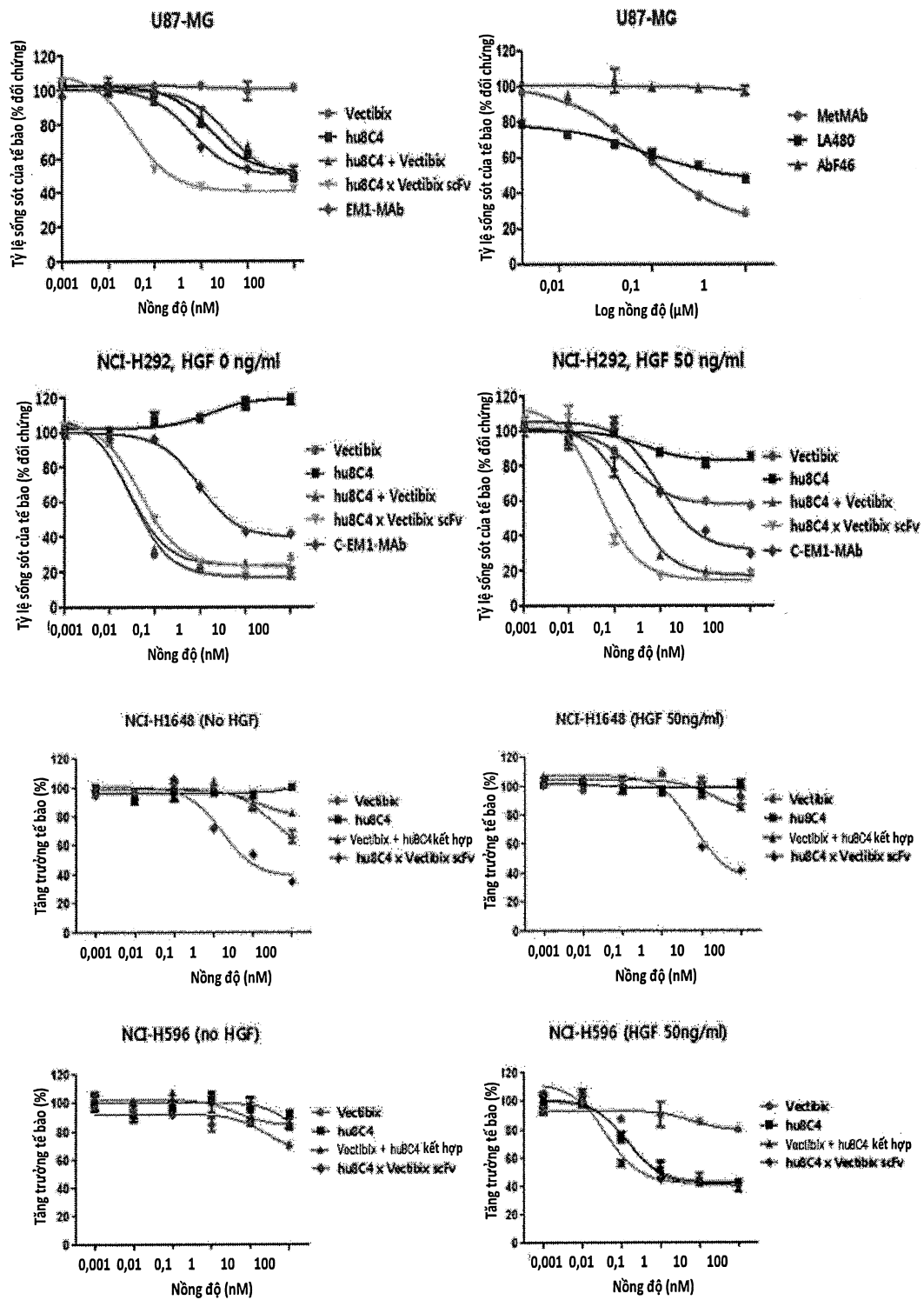


Fig.6

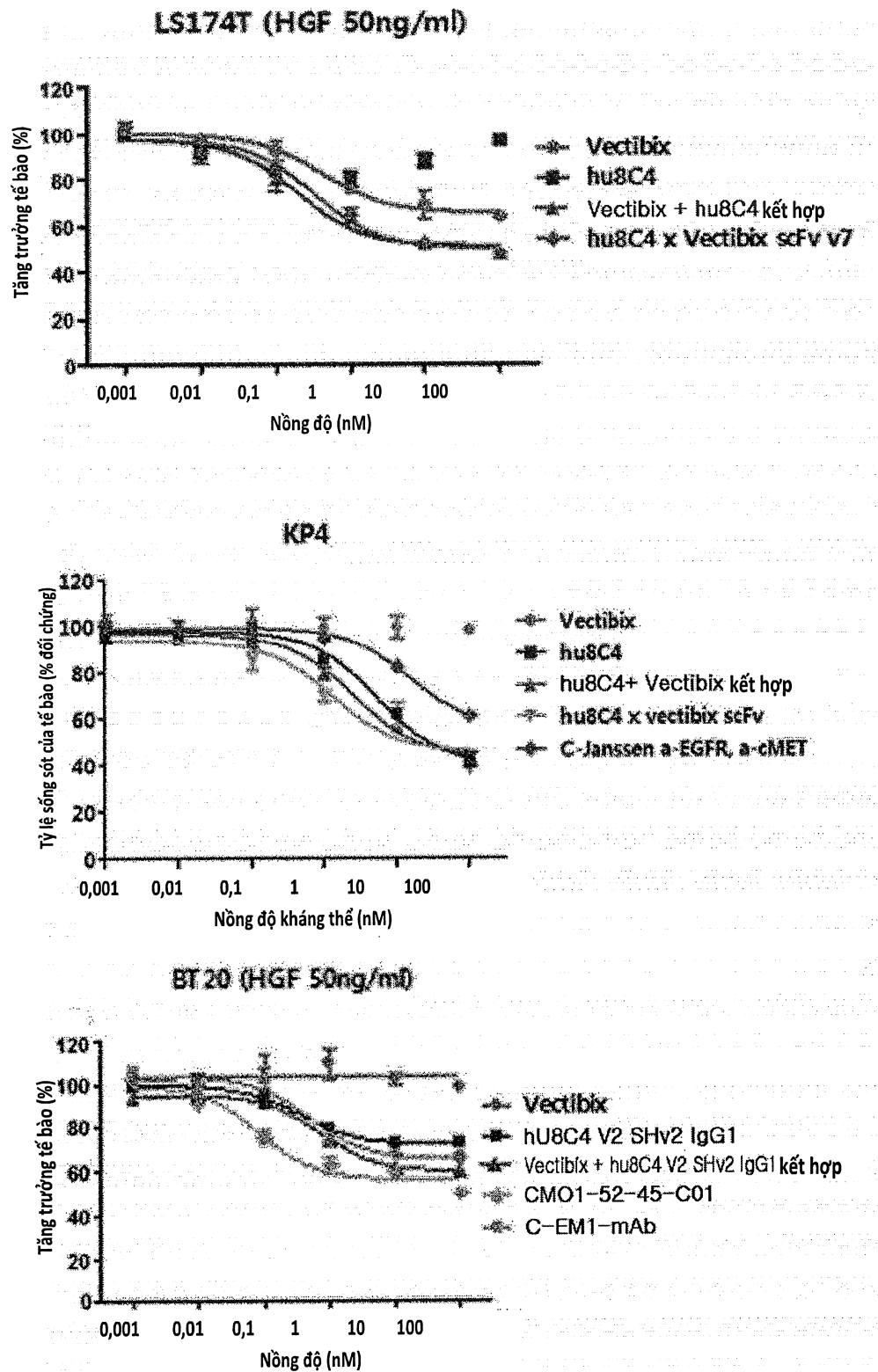


Fig.7

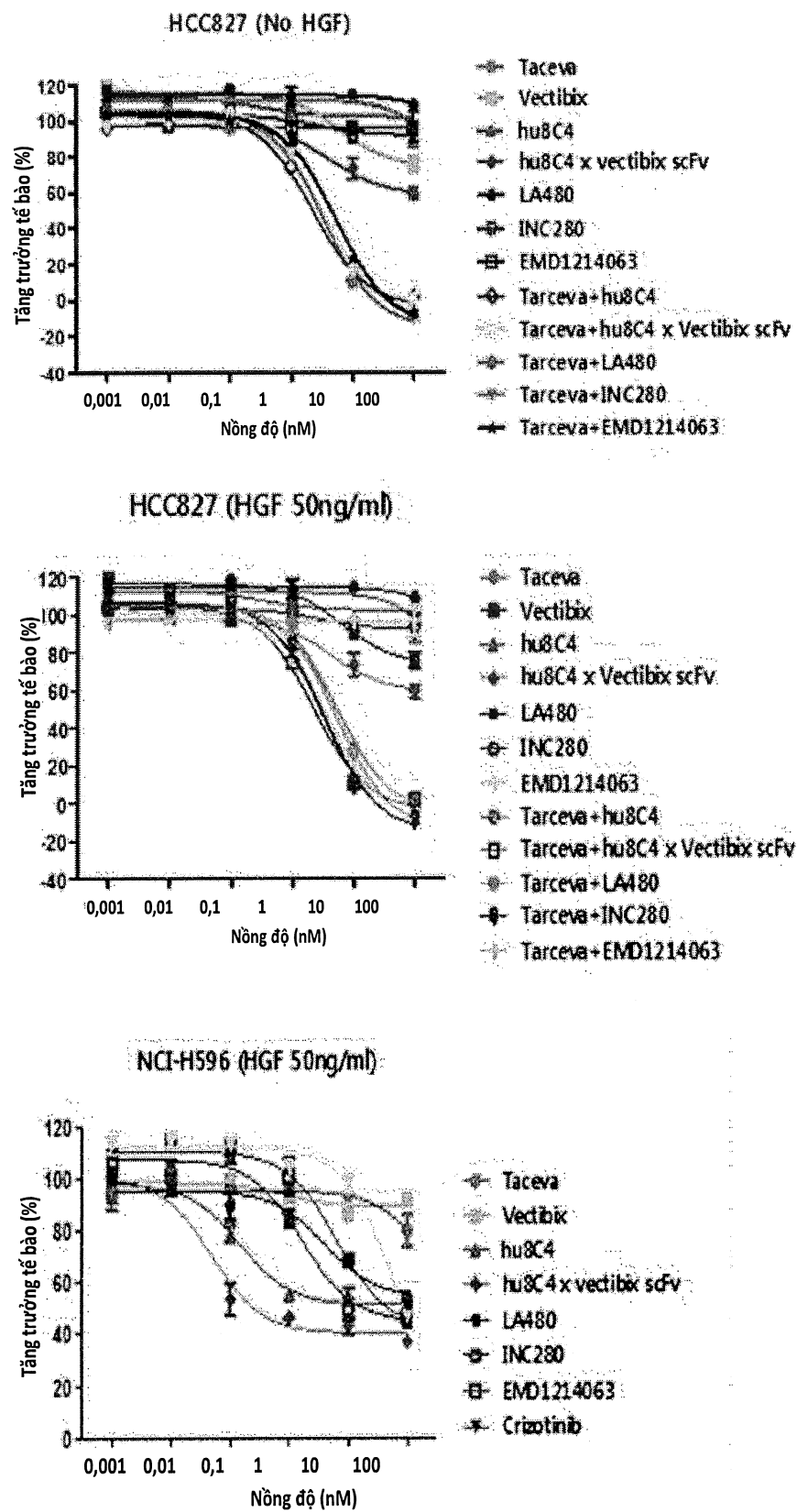


Fig.8

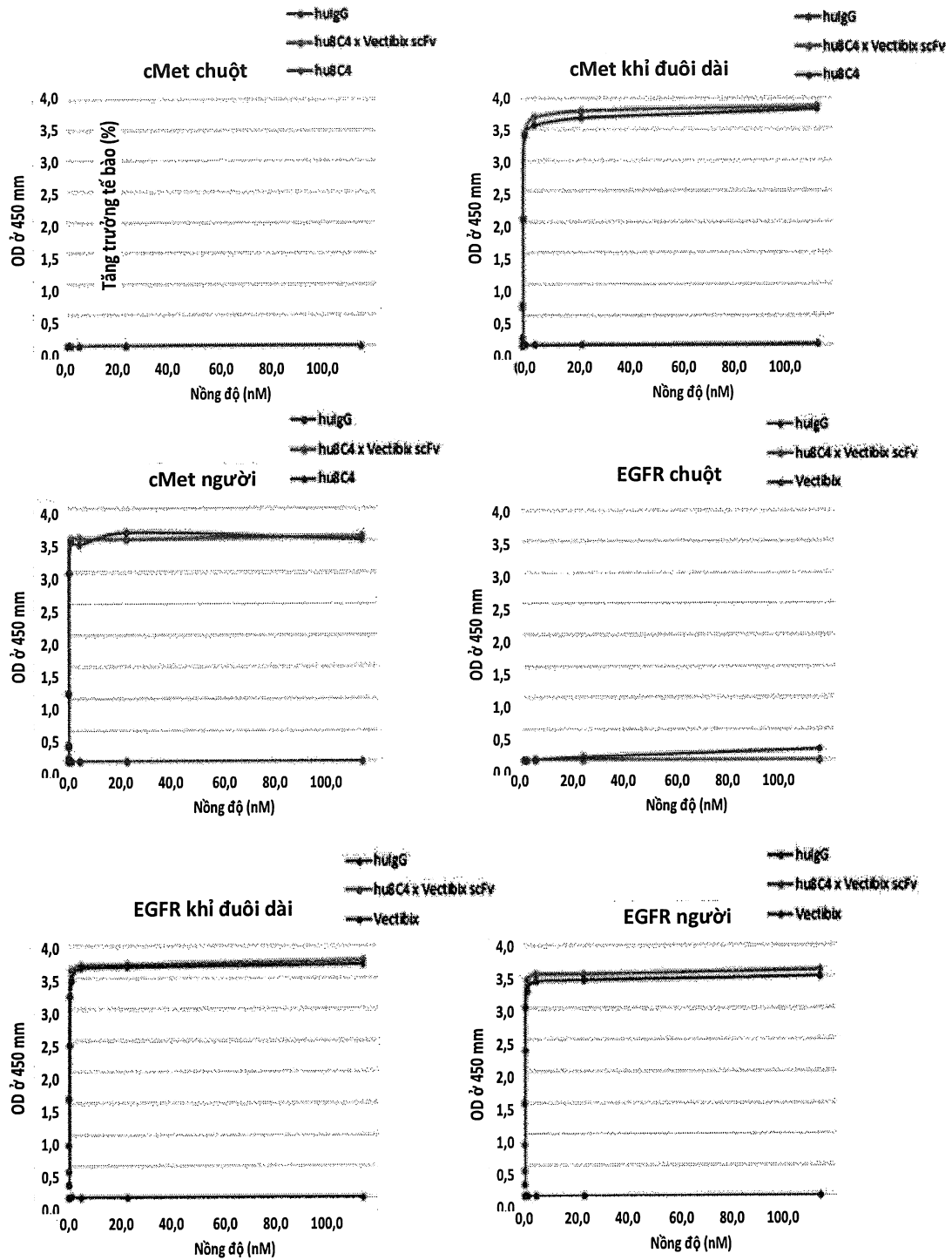


Fig.9

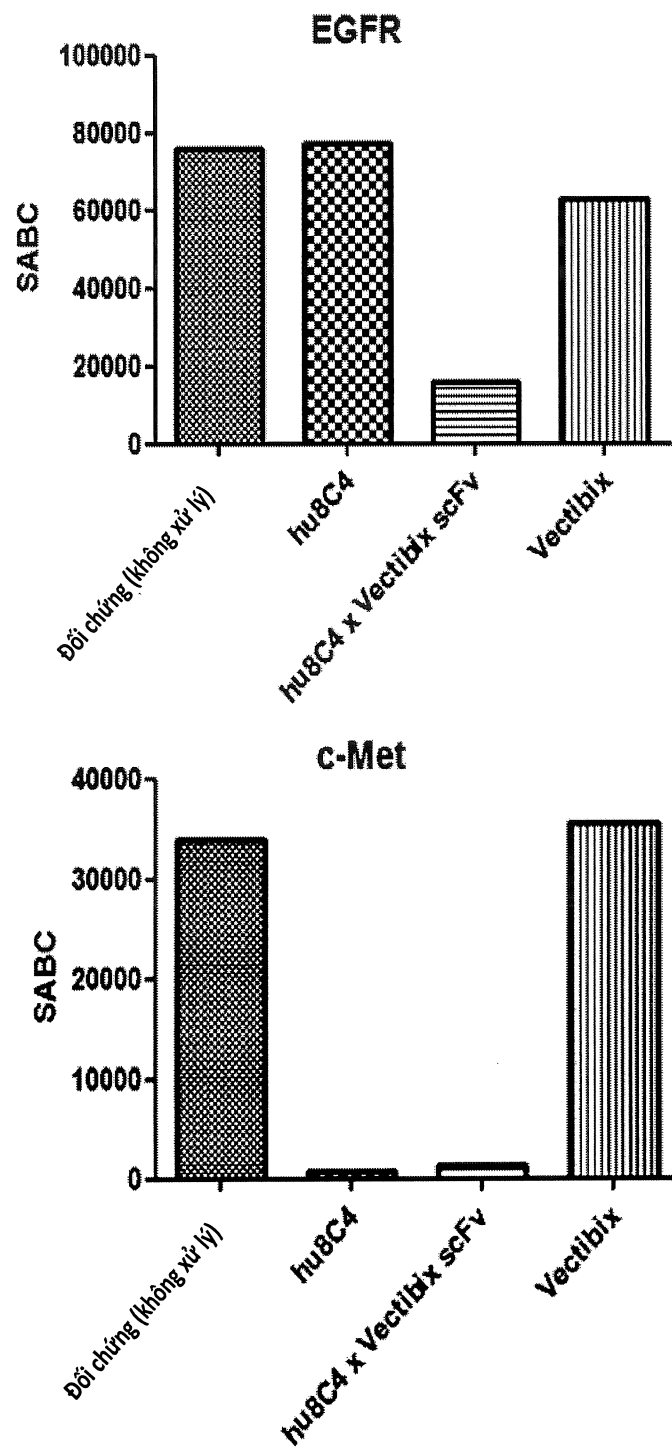


Fig.10

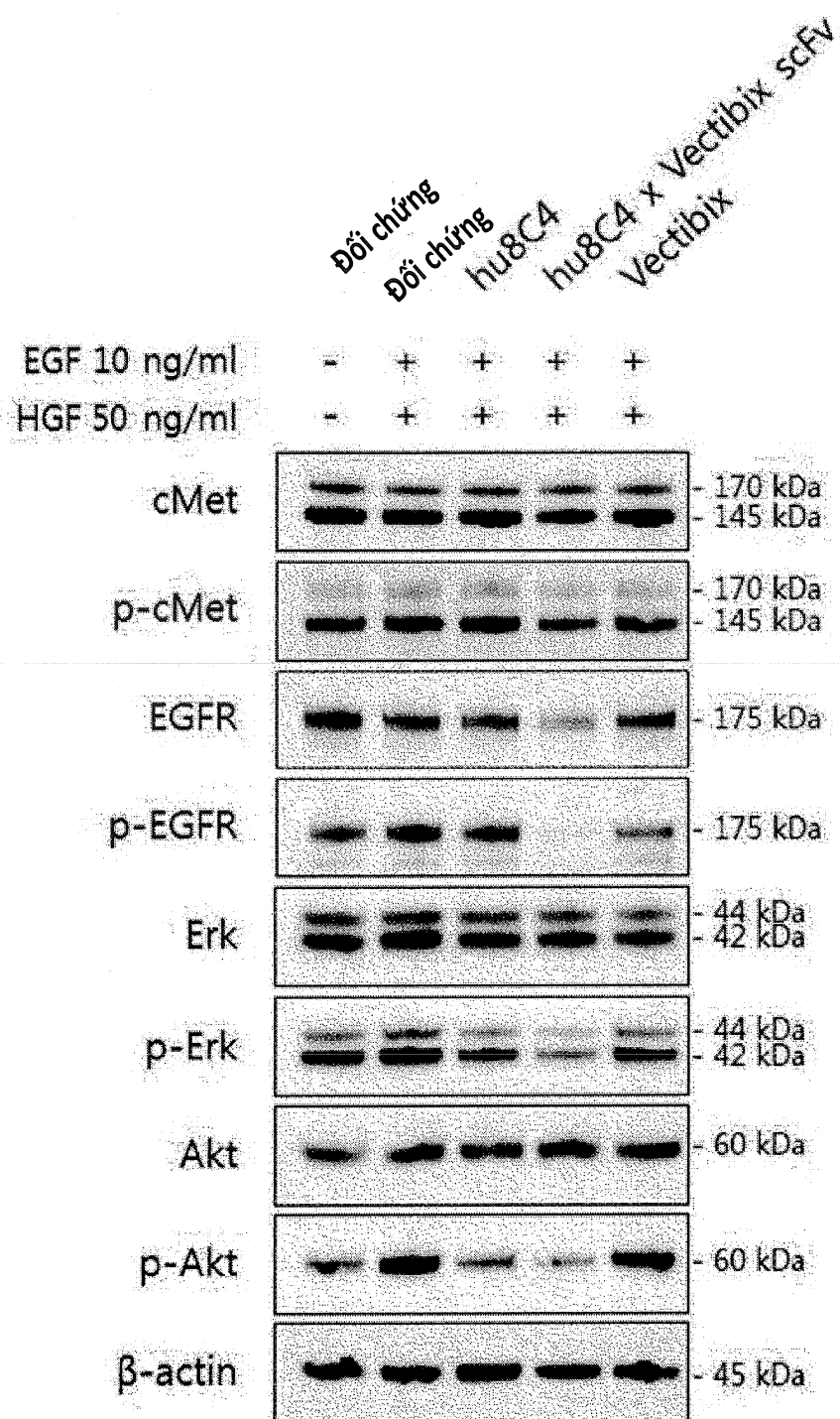


Fig.11

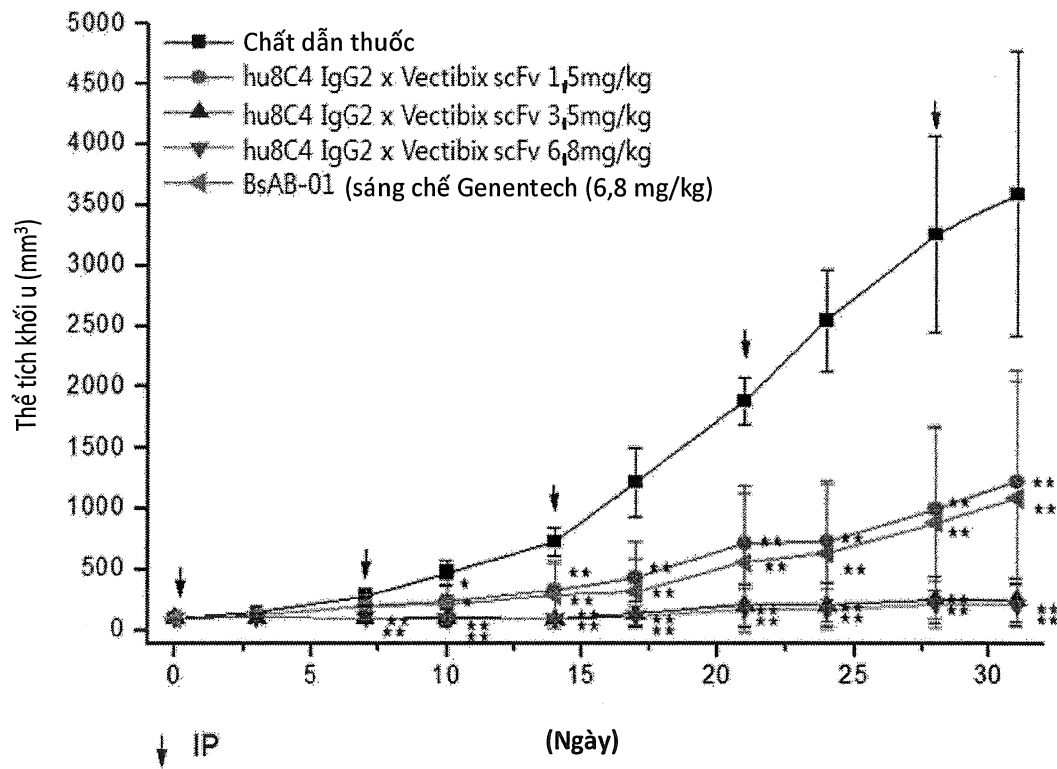


Fig.12

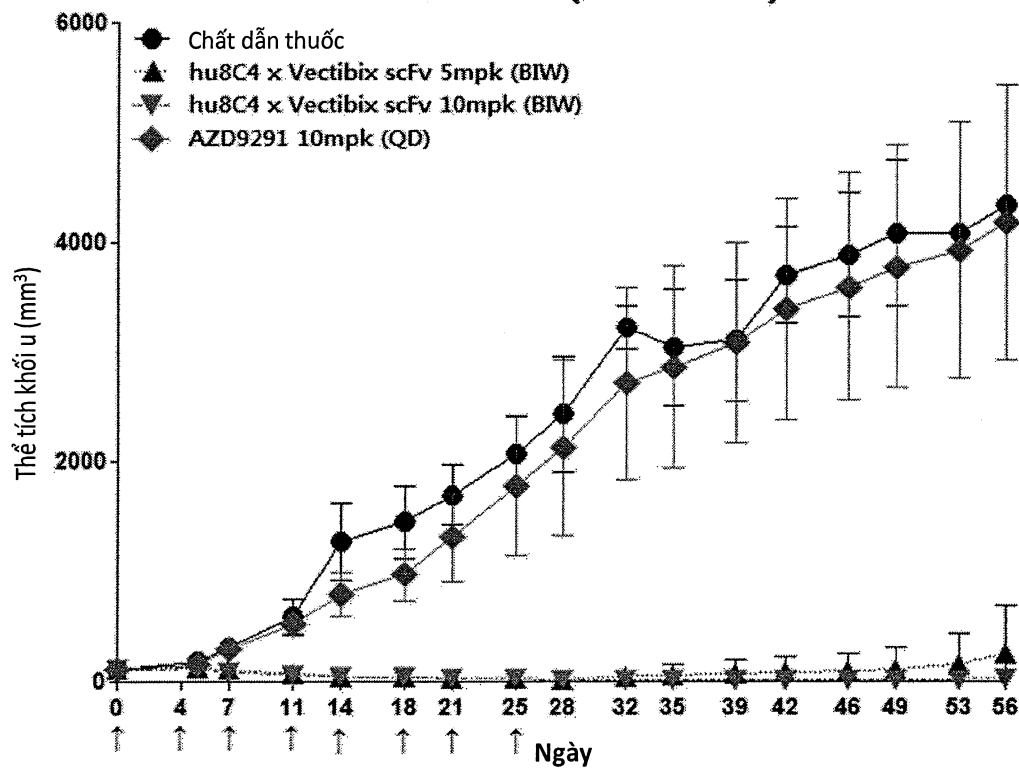


Fig.13

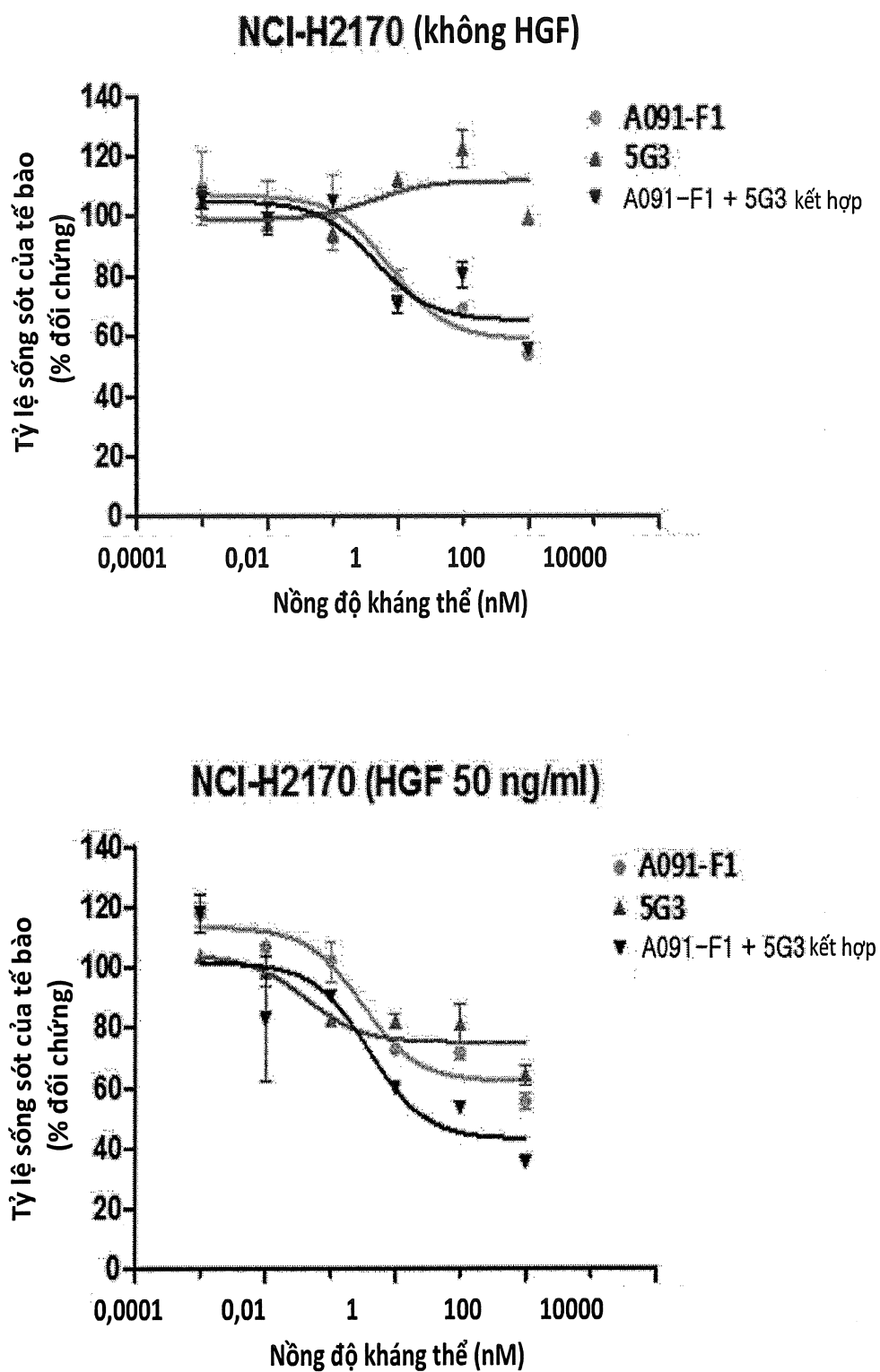


Fig.14

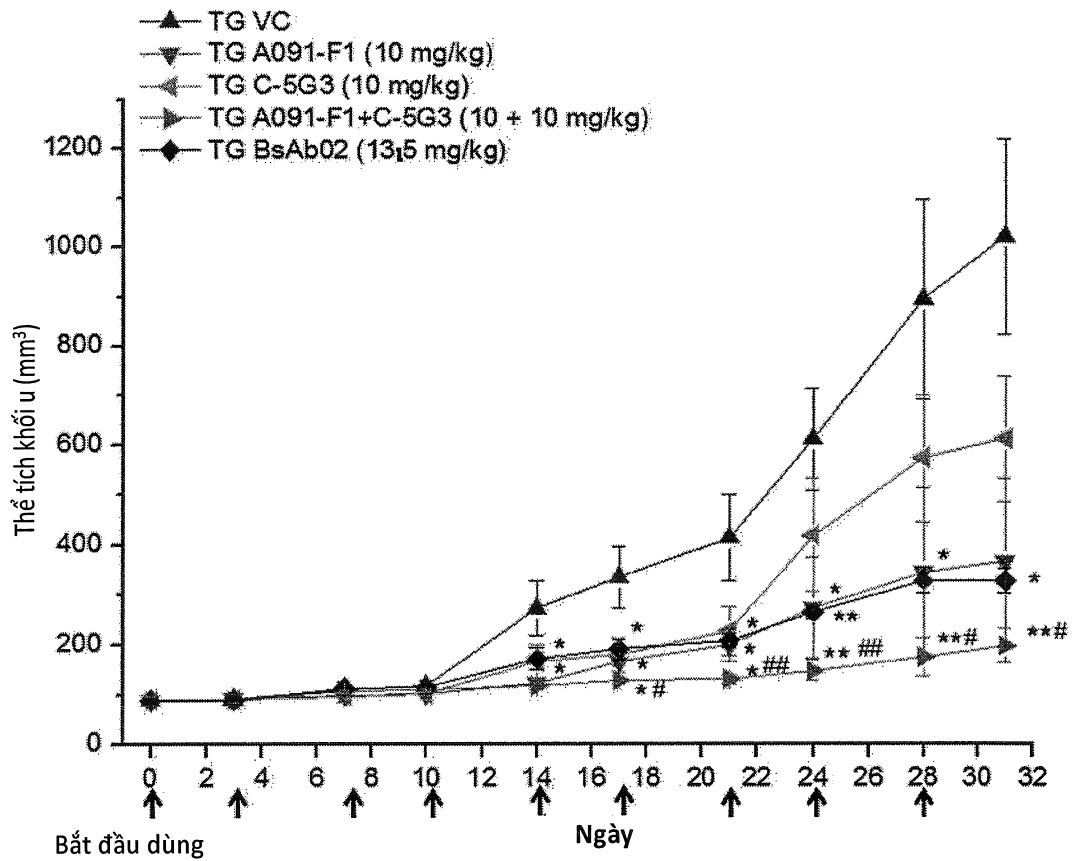


Fig.15

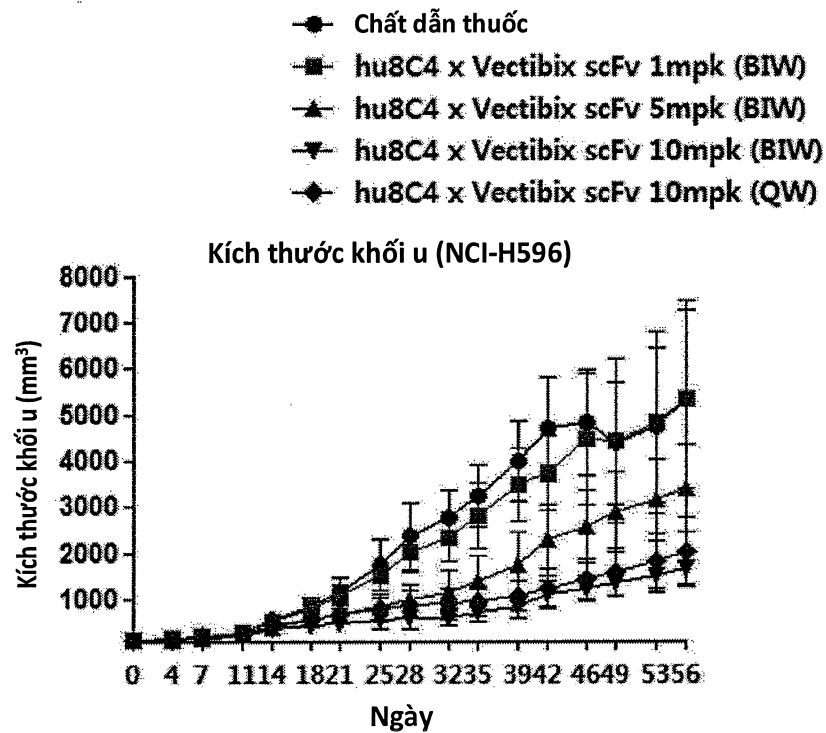


Fig.16

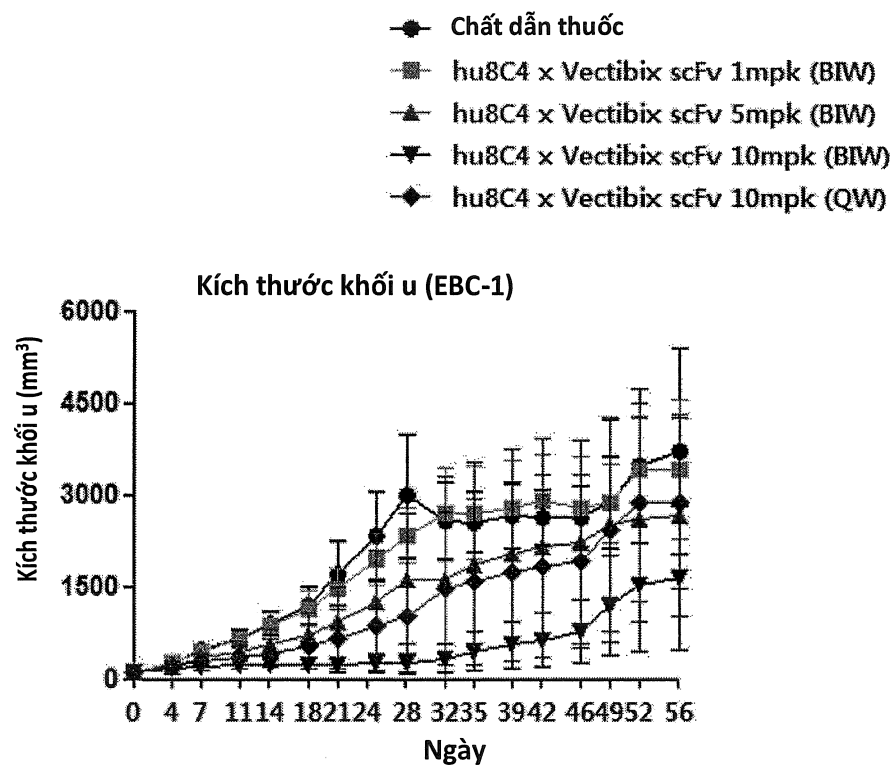


Fig.17

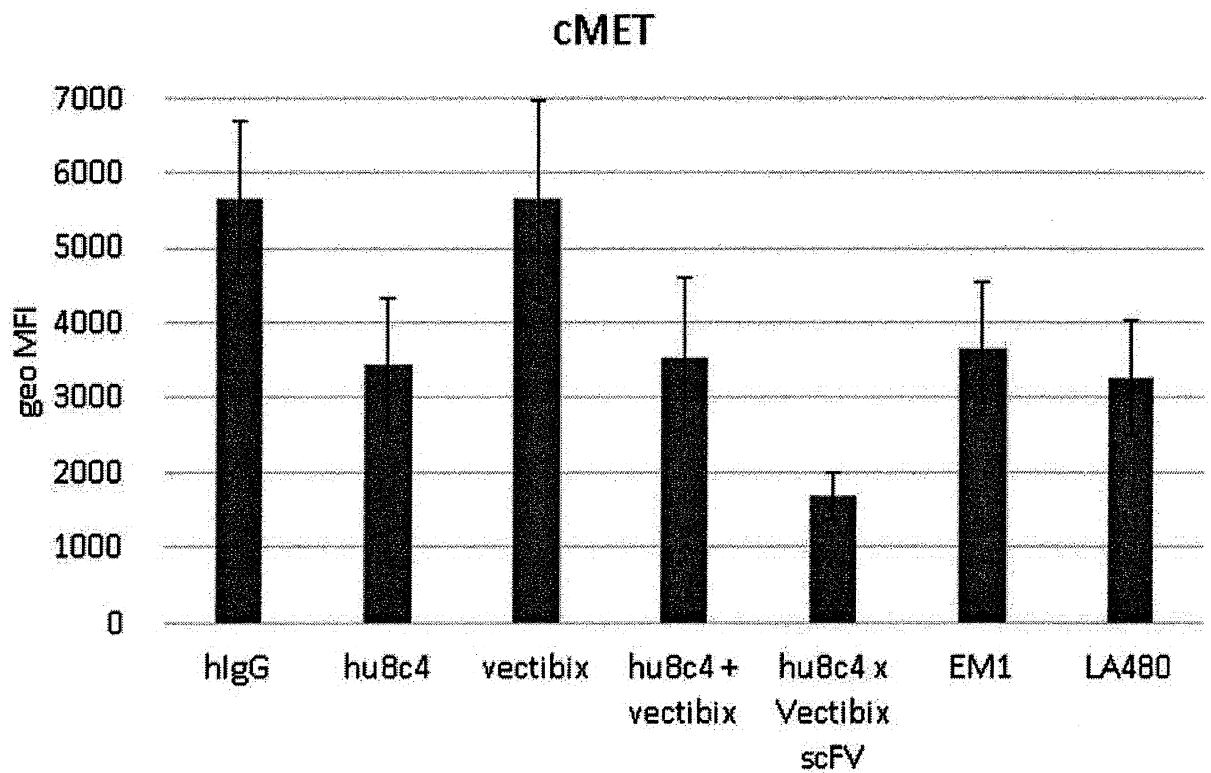


Fig.18

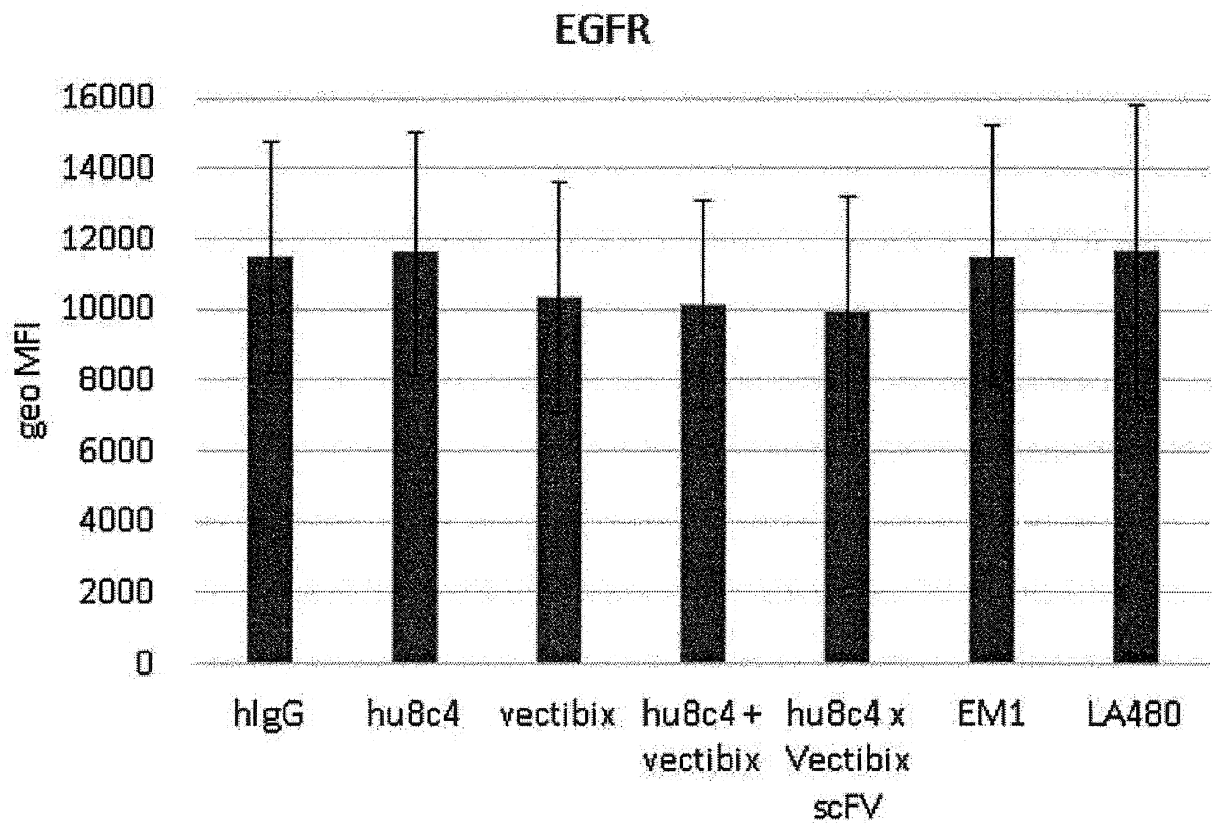
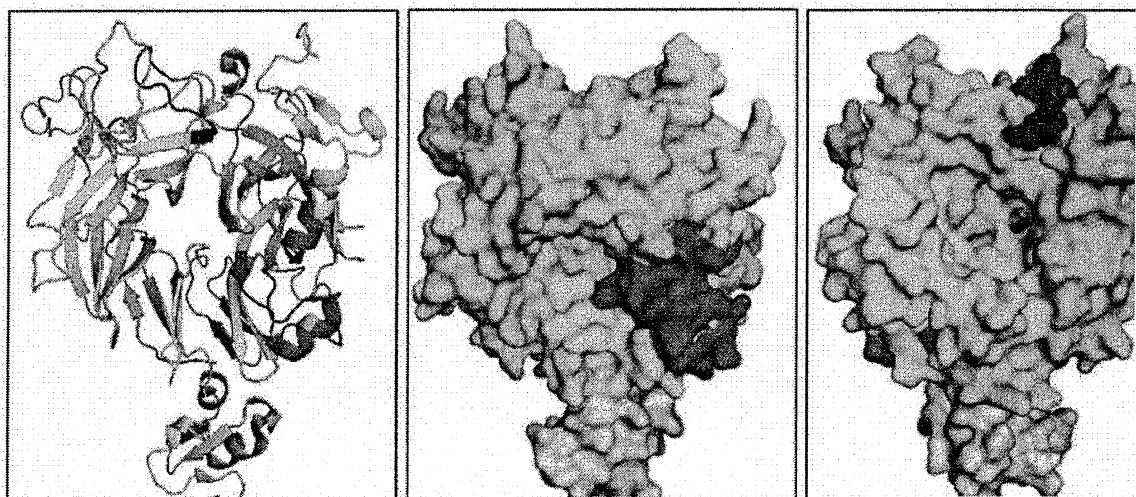


Fig.19



A. Hình mẫu

B. Bề mặt

C. Bề mặt (quay 180°)

Chuỗi α
 Chuỗi β
 PSI

hu8C4 x Vectibix
 scFv Epitop

Vùng có sự thay đổi
 cấu trúc do gắn
 hu8C4 x Vectibix scFv

Fig.20

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.

<120> Kháng thể kháng c-Met, phương pháp phát hiện kháng nguyên c-Met và chế phẩm chứa kháng thể này

<130> P18026-CKD

<150> KR 10-2017-0067106

<151> 2017-05-30

<160> 335

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 8C4 chuỗi nhẹ CDR 1

<400> 1

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 8C4 chuỗi nhẹ CDR 2

<400> 2

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 8C4 chuỗi nhẹ CDR 3

<400> 3

Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 5G3 chuỗi nhẹ CDR 1

<400> 4

Ser Ala Thr Ser Ser Val Arg Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 5G3 chuỗi nhẹ CDR 2

<400> 5

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 5G3 chuỗi nhẹ CDR 3

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 8C4 chuỗi nặng CDR 1

<400> 7

Asp Tyr Tyr Ile Asn

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 8C4 chuỗi nặng CDR 2

<400> 8

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hybridoma 8C4 chuỗi nặng CDR 3

<400> 9
 Gly Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hybridoma 5G3 chuỗi nặng CDR 1

<400> 10
 Asp Tyr Thr Leu His
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hybridoma 5G3 chuỗi nặng CDR 2

<400> 11
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hybridoma 5G3 chuỗi nặng CDR 3

<400> 12

Gly His Met Asp Tyr

1 5

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hybridoma 8C4

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Gln Phe Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu His Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hybridoma 5G3

<400> 14

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Arg Tyr Met
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Asn Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Arg Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 15
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng hybridoma 8C4

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Gly Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Gly Gly Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ala
 115

<210> 16
 <211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hybridoma 5G3

<400> 16

Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly His Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hybridoma 8C4

<400> 17

gatattctga tgaccagtc tccagcttca ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtg gagcaagtga gaatatttac ggtgctttaa attggtatca gcgaaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct gatctatggt gcaaccaact tggcagatgg catgtcatcg 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggtagacag tttctctca agatcactag cctgcatcct 240
gacgatgttg caacgtatta ctgtcaaaat gtgctaagta gtccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 18

<211> 318

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hybridoma 5G3

<400> 18

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccacctc aagtgtacgt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120
tctccccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctggtcgc 180
ttcagcggca gtgggtctgg gaccttaac tctctcaca tcagccgatt ggaggctgaa 240
gatgctgcca ctattactg ccagcagtgg agtagttacc cacggacgtt cggaggaggc 300
accaagctgg aaatcaaa 318

<210> 19

<211> 348
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng hybridoma 8C4

<400> 19
 gaggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc cgggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg ctctggcta caccttcagt gactactata taaactgggt gaagcagggg 120
 actggacagg gccttgagtg gattggagag attttcctg gaagtggaaa tactcacttc 180
 agtgcgaggt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctacggac tctgcagtct atttctgtgc cgggggtgac 300
 tacgggtttc ttactgggg cggagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 20
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng hybridoma 5G3

<400> 20
 cagggccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg ctctggcta cacctttact gactacacgc tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatacctt acagtggta tactaattac 180
 aatcagaaat tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactga gcggcctgac atctgaagac tctgcagtct ttattgtgc aagaggacat 300

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 342

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu8C4-1

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu8C4-2

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu8C4-1

<400> 23

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu8C4-2

<400> 24

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

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

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu8C4-1

<400> 25

gatatccaga tgaccagtc tcccagcagt cttccgctt ctgtgggtga tagggtgacg 60

ataacttgcg gagcaagtga gaatatttac ggtgctttaa attggtacca gcagaagcct 120

gggaaagctc caaagctgct gatctatggt gcaaccaact tggcagatgg cgtccctagc 180

aggttcagcg gcagtggaag cggcagagac ttcacttca caatctcctc cctgcaaccc 240

gaggacattg caacctacta ttgtcaaaat gtgctaagta gtccgtacac gtttgccag 300

ggaaccaagg ttgaaattaa a 321

<210> 26
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu8C4-2

<400> 26
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcg gagcaagtga gaatatctac ggtgctttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagttc ctaagctcct gatctatggg gcaaccaact tggcagatgg ggtcccatct 180
 cgggttcagt gcagtggatc tgggcgagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaat gtgctaagta gtccgtacac gtttggccag 300
 ggaaccaagg ttgaaattaa a 321

<210> 27
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu8C4-1

<400> 27
 gaggttcagt tagtggaatc cggaggagga ctggtgcagc ctggtggaag ttgaggctg 60
 tcatgcgcag ccagtggcta caccttcagt gactactata taaactgggt aagacaggct 120
 cccggaaaag ggctggagtg gattggagag attttcctg gaagtggaaa tactcacttc 180

agtgcgaggt tcaagggccg agccaccctc tcagcagaca aaagcaagaa taccgcctat 240

ctgcagatga atagccttcg cgcagaagat actgccgtgt attactgtgc cgggggtgac 300

tacgggtttc ttactgggg acagggcacc ttgtgacag tctcttct 348

<210> 28

<211> 348

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu8C4-2

<400> 28

caggttcagt tagtggaaac cggaggagga ctggtgaagc ctggtggaag ttgaggctg 60

tcatgcgcag ccagtggcta caccttcagt gactactata taaactggat cagacaggct 120

cccggaaaag ggctggagtg gattggagag attttcctg gaagtggaaa tactcacttc 180

agtgcgaggt tcaagggccg agccaccatc tcagcagaca aagcgaagaa tagcgctat 240

ctgcagatga atagccttcg cgcagaagat actgccgtgt attactgtgc cgggggtgac 300

tacgggtttc ttactgggg acagggcacc ttgtgacag tctcttct 348

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu5G3-1

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Arg Tyr Met
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Asn Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu5G3-2

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Arg Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

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

<210> 31
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu5G3-1

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly His Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 32

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu5G3-2

<400> 32

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 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly His Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 33

<211> 318

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu5G3-1

<400> 33

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctctgca gtgccacctc aagtgtacgt tacatgtact ggtaccagca gaaacctggc 120

cagtctcca ggctctcat ctatgacaca tccaacctgg ctctggcat cccagcaagg 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacagacaac actctacca tcagcagact ggagcctgaa 240

gattttgcag ttattactg tcagcagtgg agtagttacc cacggacgtt cggcggaggg 300

accaaggtgg agatcaaa 318

<210> 34

<211> 318

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu5G3-2

<400> 34

gacatccaga tgactcagag tcctcttct ctgtctgcct cagtgggaga tcgggtcaca 60

atcacatgtt cagcaacaag ctcaagtgcga tacatgtatt ggtaccagca gaagccaggc 120
aaagcccaaa agctgctgat ctatgacaca tctaattctgg ccagcggcgt cccatctcgc 180
ttctcaggct ccggaagcgg tactgatttt accctgacta ttcttcctt gcagcctgag 240
gacttcgcaa cctattattg ccagcagtgg tctagctacc ctcgcacatt cggccaggga 300
accaaggtcg aaattaaa 318

<210> 35
<211> 342
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu5G3-1

<400> 35
caggtgcagc tgggtgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcttgaagg catctggata caccttcacc gactacacgc tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gataggatac attaatcctt acagtgggta tactaattac 180
aatcagaaat tcaaggacag agtcaccttg accgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc tagaggacat 300
atggactact ggggccaagg aaccctgggtc accgtctcct ca 342

<210> 36
<211> 342
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng hu5G3-2

<400> 36

gaagtccaac ttgtggagtc aggaggcggg ctcgtgcagc caggcggatc attgcgactt 60

tcttgctg cctcagggtg caccttcaact gattatacct tgcattgggt tcgccaagca 120

cccggtaagg gtctcgaatg ggtaggatac attaatccat acagcggcta caccaactac 180

aaccagaaat tcaaagacag ggctaccctt agtgccgaca agtctaagaa caccgcctac 240

cttcagatga actcccttag agccgaggat actgctgtgt ttattgcgc taggggtcat 300

atggactact ggggacaggg gacctgggtg actgtgtctt cc 342

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bản lẻ của vùng hằng định IgG1 CH

<400> 37

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 38

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 39

Glu Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 40

Glu Arg Lys Cys Cys Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 41

Glu Cys Cys Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 42

Glu Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 43

Glu Arg Lys Cys Cys Val Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 44

Glu Lys Cys Cys Val Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 45

<211> 45

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bản lề của vùng hằng định IgG1 CH

<400> 45

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccca

45

<210> 46

<211> 36

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lề IgG1 CH

<400> 46

gagcgaaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgccca

36

<210> 47

<211> 30

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 47

gagtgttg tg tcgagtgccc accgtgcca 30

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 48

gagcgaaaat gttgttgccc accgtgcca 30

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 49

gagtgttggt gccaccgtg ccca 24

<210> 50

<211> 33

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 50

gagaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc cca

33

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 51

gagcgaaaat gttgtgtctg cccaccgtgc cca

33

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của bản lẻ IgG1 CH

<400> 52

gagaaatgtt gtgtctgccc accgtgccca

30

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> linker

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 54

Glu Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 55

Glu Ile Glu Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 56
 Glu Ile Trp Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 57
 Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 58

Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 59

Glu Ile Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 60

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Tyr Thr His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 61

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Trp Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 62

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 63
 Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Ala Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR3

<400> 64
 Gln Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr
 1 5

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR3

<400> 65

Glu Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 66

His Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 67

Asn Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 68

Val Glu Leu Gly Phe Leu Tyr

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 69

Phe Glu Thr Gly Tyr Tyr Leu

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 70

Gly Glu Tyr Gly Tyr Gln Asn

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 71

Trp Glu Tyr Gly Leu Ser Met

1 5

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 72

Glu Ile Phe Pro His Phe Thr Ser Asp His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 73

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Trp Met Gly

1 5 10 15

Thr

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 74
Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Glu Ser Val Ser Phe Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 75
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 75
Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ser Ala Val Ile Ser Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 76
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 76

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn His Thr Val Val Arg Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 77

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Leu Ser Met His Gly Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 78

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn His Thr Pro Val Phe Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 79

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Pro Phe Leu Thr Ile Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 80

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 81
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Leu Ser Gly Ile Arg Ser Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 82
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Phe Phe His Gly Lys Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 83

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Pro Arg Leu Gly Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 84

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Val Ser Gln Val Glu Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 85

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Phe His Gly Ala Ser Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 86
Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Val Val Gly Gly Tyr Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 87
Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Pro Met Tyr Asp Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 88
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ala Asp Leu Thr Ile Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 89
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ser Thr Asn Leu Tyr Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 90

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Leu Asp Ile Pro Pro Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 91

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ser Ala Pro Leu

1 5 10 15

Pro

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 92

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ser Glu Phe Val

1 5 10 15

Ser

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 93

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Met Ser Glu Ser

1 5 10 15

Phe

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 94

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Asp Gly Ser Arg

1 5 10 15

Asn

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 95
Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ser Ser Val Ser
1 5 10 15

Arg

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 96
Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Val Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 97

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Gly Leu Ser Glu
1 5 10 15

Val

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 98

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser His Tyr Trp Ala
1 5 10 15

Ser

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 99

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Thr Gly Leu Thr
1 5 10 15

Gln

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 100

Glu	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	His	Phe	Ser	Arg	His	Arg	Leu
1			5			10			15						

His

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 101

Glu	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	His	Phe	Ser	Val	Pro	Arg	Ser
1			5			10			15						

Met

<210> 102

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

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 102
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Leu Gln Asp Tyr
 1 5 10 15

Leu

<210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 103
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Asp Gly Val Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 104

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Met Gln Gly Ser

1 5 10 15

Glu

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 105

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Gly Asn Val His

1 5 10 15

Trp

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 106

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 107
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 107
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Leu Arg Met Phe
 1 5 10 15

Pro

<210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR1

<400> 108
 Asp Tyr Tyr Ala Asn
 1 5

<210> 109
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR1

<400> 109

Gly Tyr Tyr Ile Asn

1 5

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR1

<400> 110

Gln Tyr Tyr Ile Asn

1 5

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR1

<400> 111

Asp Gln Tyr Ile Asn

1 5

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR1

<400> 112

Asp Tyr Tyr Gln Asn

1 5

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 113

Gly Asp Val Gly Phe Leu Tyr

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 114

Gly Asp Tyr Gly Phe Gln Tyr

1 5

<210> 115

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

<220>
<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 115
Gly Asp Tyr Gly Phe Leu Gln
1 5

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 116
Gly Asp Gln Trp Leu Leu Cys
1 5

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR3

<400> 117
Trp Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr
1 5

<210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 118
 Glu Ile Phe Pro Asp Ser Ala Pro Ser His Phe Ser Ala Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 119
 Glu Ile Phe Pro Tyr Phe Leu Pro Pro His Phe Ser Ala Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 120

Glu Ile Phe Pro Gly Pro Phe Thr Pro His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 121

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Asn Phe Gly His Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 122

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 122

Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 123

Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 124

Glu Ile Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Ala Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 125
 Glu Ile Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro Thr
 1 5 10 15

Pro

<210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 126
 Glu Ile Phe Pro Gly Tyr Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 127

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Arg Ser Pro Thr
1 5 10 15

Pro

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 128

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ser His Val Val Arg Ser Pro Thr
1 5 10 15

Pro

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 129

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ser His Val Val Ser Ser Pro Thr
1 5 10 15

Pro

<210> 130
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 130
Glu Ile Phe Pro Asp Ser Ala Pro Ser Tyr Phe Ser Ala Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 131
Glu Ile Phe Pro Gly Pro Phe Thr Pro Tyr Phe Ser Ala Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 132

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

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 132
 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Asn Phe Gly Tyr Phe Ser Arg Ser Pro Thr
 1 5 10 15

Pro

<210> 133
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 133
 Glu Ile Phe Pro Asp Ser Ala Pro Ser His Val Val Ser Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 134
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CH CDR2

<400> 134

Glu Ile Phe Pro Gly Pro Phe Thr Ser His Val Val Ser Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 135

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 135

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Asn Phe Ser His Val Val Ser Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 136

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 136

Glu Ile Phe Pro Asp Ser Ala Pro Ser His Phe Ser Arg Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 137

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 137

Glu Ile Phe Pro Gly Pro Phe Thr Pro His Phe Ser Arg Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 138

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 138

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Asn Phe Gly His Phe Ser Arg Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 139

Glu Ile Phe Pro Asp Ser Ala Pro Ser His Val Val Ser Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 140

Glu Ile Phe Pro Gly Pro Phe Thr Ser His Val Val Ser Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 141

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CH CDR2

<400> 141

Glu Ile Phe Pro Gly Ser Asn Phe Ser His Val Val Ser Ser Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 142

Gln Asn Val Trp Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 143

Gln Asn Val Leu Asn Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 144

Gln Asn Val Leu Glu Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 145

Gln Asn Val Leu Lys Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 146

Gln Asn Val Leu Tyr Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 147

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 147
Gln Asn Val Leu Ser Arg Pro Tyr Thr
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 148
Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 149
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 149
Gln Asn Val Leu Ser Glu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 150
Gln Asn Val Leu Glu Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 151
Gln Asn Val Leu Ser Val Pro Glu Thr
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 152
Gln Asn Val Leu Ser Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 153

Gln Asn Val Leu Ser Ile Pro Glu Thr

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 154

Gln Asn Val Leu Ser Met Pro Glu Thr

1 5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 155

Gln Asn Ile Leu Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 156

Gln Asn Leu Ile Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 157

Gln Asn Met Ile Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 158

Gln Asn Ile Ile Ser Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 159

Gln Asn Ile Ile Ser Ile Pro Glu Thr

1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 160

Gln Asn Ser Leu Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 161

Gln Asn Thr Leu Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 162

Gln Asn Val Ser Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 163

Gln Asn Val Ile Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 164

Gln Asn Val Phe Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 165

Gln Asn Val Tyr Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 166

Gln Asn Val Arg Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 167

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 167
Gln Asn Leu Val Ser Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 168
Gln Asn Leu Met Ser Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 169
Gln Asn Ile Met Ser Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 170
Gln Asn Val His Ser Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 171
Gln Asn Val Met Ser Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 172
Gln Asn Leu Leu Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 173

Gln Ser Val Leu Phe Ser Pro Phe Ser

1 5

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 174

Gln Gln Val Leu Phe Phe Pro Glu Thr

1 5

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 175

Gln Asn Leu Leu Ser Pro Ser Phe Tyr

1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 176

Gln Ser Val Leu Phe Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 177

Gln Asn Ile Leu Ser Ser Pro Leu Phe

1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 178

Gln Asn Thr Leu His Tyr Ser Leu Val

1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 179

Gln Gln Val Leu Phe Phe Pro Leu Leu

1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 180

Gln Gln Val Leu Asp Phe Val Phe Tyr

1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 181

Gln Asn Val Val Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 182

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 182

Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 183

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 183

Phe Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 184

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 184

His Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 185

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 185

Lys Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 186

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 186

Pro Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 187

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 187
Gln Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 188
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 188
Ser Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 189
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 189
Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 190
Tyr Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 191
Ile Thr Val Leu Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 192
Gln Asn Asn Leu Val Pro Pro Phe Asn

1 5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 193

Gln His Val Leu Phe Leu Pro Tyr Val

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 194

Gln Ala Val Leu Thr Asn Ala Tyr Thr

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 195

Gln Asn Val Leu Arg Val Gly Tyr Leu

1 5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 196

Gln Ser Val Leu Arg Val Gly Tyr Leu

1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 197

Gln Asn Ile Ile Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 198

Gln Gln Val Leu Cys Glu Ser Phe Leu

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 199

Gln Asn Val Leu Ser Gln Ser Leu Leu

1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 200

Gln Asn Val Leu Gln Pro Ser Tyr Leu

1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 201

Gln Asn Leu Leu Phe Gln Pro Leu Ser

1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 202

Gln Asn Val Leu Phe Gln Pro Leu Val

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 203

Gln Asn Gln Leu Asp Pro Ser Leu Phe

1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 204

Met Asp Val Leu Glu Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 205

Gln Ala Leu Leu Leu Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 206

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 207

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 207
Asn Leu Thr Leu Val Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 208
Gly Asn Ile Leu Asp Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 209
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 209
Glu Gln Val Leu Leu Ser Pro Tyr Thr
1 5

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 210
Asn Asn Leu Leu Asp Ser Pro Tyr Thr
1 5

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 211
Glu Glu Val Leu Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 212
Gln Asn Ile Leu Phe Val Asp Tyr Thr

1 5

<210> 213

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 213

Gln Asn Val Leu His Leu Asn Tyr Thr

1 5

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 214

Gln Asn Val Leu Gln Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 215

Gln Asn Ile Leu His Pro Gly Tyr Thr

1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 216

Gln Asn Val Leu Thr Arg Gly Tyr Thr

1 5

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 217

Glu Asn Ile Leu Tyr Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 218

Gln Asn Val Leu Gly Gly Gly Gln Gly

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 219

Gln Asn Val Leu Glu His Pro Leu Ile

1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 220

Gln Asn Val Leu Asp Asp Pro Phe Asp

1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 221

Gln Asn Val Leu Asp Phe Pro Leu Leu

1 5

<210> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 222

Gln Asn Val Leu Tyr Pro Ser Leu Val

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 223

Gln Asn Val Leu Phe Asp Gln Gln Ser

1 5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 224

Gln Asn Val Leu Ser Asn Glu Glu Thr

1 5

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 225

Gln Asn Val Leu Lys His Pro Tyr Thr

1 5

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 226

Gln Asn Val Leu Ser Pro Gly Met Trp

1 5

<210> 227

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 227
Gly Ala Thr Gly Leu Ala Asp
1 5

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR2

<400> 228
Gly Ala Gln Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 229
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 229
Gly Ser Ser Arg Ser Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 230
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 230
Arg Ala Gly Arg Ser Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 231
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 231
Leu Gly Arg Arg Gly Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 232
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 232
Glu Val Gln Val Gly Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 233

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 233

Arg Pro Ser Glu Lys Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 234

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 234

Arg Ala Ser Ala Val Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 235

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 235

Lys Thr Gly Asp Leu Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 236

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 236

Ser Cys Arg Val Pro Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 237

Val Ala Ser Arg Gly Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 238

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 238

Arg Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 239

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 239

Ala Ala Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 240

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 240

Ser Ala Pro Phe Lys Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 241

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 241

Leu Gly Met Asp Asp Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 242

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 242

Asn Val Arg Arg Gly Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 243

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 243

Asn Thr Ser Gly Arg Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 244

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 244

Leu Val Ser Arg Pro Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 245

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 245

Trp Thr Asn Arg Pro Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 246

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 246

Arg Ile Pro Ser Ala Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 247

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 247
Gly Ala Thr Arg Gly Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 248
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 248
Glu Gly Gly Ser Pro Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 249
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 249
Gly Ala Ser Arg Gly Met Phe Arg Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 250
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 250
Gly Ala Ser Gly Leu Val Phe Ser Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 251
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 251
Gly Ala Ser Arg Gly Thr His Met Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 252
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 252
Gly Ala Ser Ser Arg Phe His Asn Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 253

Gly Ala Ser Arg Thr Ala Phe Thr Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 254

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 254

Gly Ala Ser Arg Ser Thr Phe Ser Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 255

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 255

Gly Ala Ser Gly Pro Met Phe Asp Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 256

Gly Ala Ser His Asp Leu Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 257

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 257

Gly Ala Ser Gly Thr Leu Phe Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 258

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 258

Gly Ala Ser Lys Ala Ala Phe Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 259

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 259

Gly Ala Ser Glu Gly Ile Val Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 260

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 260

Gly Ala Ser His Glu Ile His Val Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 261

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 261

Gly Ala Ser Arg Gly Val Phe Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 262

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 262

Gly Ala Ser Gly Arg Val Arg Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 263

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 263

Gly Ala Ser Thr Gly Ser Phe Ser Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 264

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 264

Gly Ala Ser Gly Asn Ser Phe Asp Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 265

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 265

Gly Ala Ser Glu Gln Ser Tyr Phe Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 266

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR1

<400> 266

Gly Ala Ser Phe Arg Gln Phe Ser Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 267

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

<220>
 <223> hu8C4 CL CDR1

<400> 267
 Gly Ala Ser Ala Pro Arg His Ser Ala Leu Asn
 1 5 10

<210> 268
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CL CDR1

<400> 268
 Gly Ala Ser Met Pro Leu Phe His Ala Leu Asn
 1 5 10

<210> 269
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hu8C4 CL CDR3

<400> 269
 Gln Asn Ile Leu Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 270
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 270
Gln Asn Val Leu Ser Met Pro Tyr Thr
1 5

<210> 271
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 271
Gln Asn Val Leu Ser Glu Pro Glu Thr
1 5

<210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 272
Gln Asn Val Leu Tyr Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 273

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 273

Gln Asn Val Leu Glu Glu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 274

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 274

Gln Asn Val Leu Glu Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 275

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 275

Gln Asn Val Leu Glu Met Pro Glu Thr

1 5

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 276

Gln Asn Ile Leu Glu Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 277

Gln Asn Val Ile Glu Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 278

Gln Asn Val Met Glu Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 279

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 279

Gln Asn Leu Leu Glu Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 280

Gln Asn Val Leu Tyr Glu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 281

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 281

Gln Asn Ile Leu Ser Glu Pro Glu Thr

1 5

<210> 282

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 282

Gln Asn Val Ile Ser Glu Pro Glu Thr

1 5

<210> 283

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 283

Gln Asn Val Met Ser Glu Pro Glu Thr

1 5

<210> 284

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 284

Gln Asn Leu Leu Ser Glu Pro Glu Thr

1 5

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 285

Gln Ser Val Leu Phe Glu Pro Phe Ser

1 5

<210> 286

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 286

Gln Ser Val Leu Phe Glu Pro Phe Thr

1 5

<210> 287

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

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 287
Gln Asn Ile Leu Tyr Ser Pro Glu Thr
1 5

<210> 288
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 288
Gln Asn Ile Leu Ser Leu Pro Glu Thr
1 5

<210> 289
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 289
Gln Asn Ile Leu Ser Met Pro Glu Thr
1 5

<210> 290
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 290
Gln Asn Val Leu Tyr Met Pro Glu Thr
1 5

<210> 291
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 291
Gln Asn Val Ile Ser Met Pro Glu Thr
1 5

<210> 292
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 292
Gln Asn Val Met Ser Met Pro Glu Thr

1 5

<210> 293

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 293

Gln Asn Leu Leu Ser Met Pro Glu Thr

1 5

<210> 294

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 294

Gln Asn Ile Ile Ser Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 295

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 295

Gln Asn Val Leu Tyr Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 296

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 296

Gln Asn Val Ile Tyr Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 297

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 297

Gln Asn Val Met Tyr Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 298

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 298

Gln Asn Leu Leu Tyr Ser Pro Glu Thr

1 5

<210> 299

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 299

Gln Asn Val Ile Ser Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 300

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 300

Gln Asn Val Met Ser Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 301

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 CL CDR3

<400> 301

Gln Asn Leu Leu Ser Leu Pro Glu Thr

1 5

<210> 302

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AH71

<400> 302

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Gln Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 303

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AH72

<400> 303

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro
50 55 60

Thr Pro Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 304

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AH73

<400> 304

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 305

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AH85

<400> 305

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 306

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AL130

<400> 306

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

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

<210> 307
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AL135

<400> 307
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 308

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AL165

<400> 308

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 309

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AL166

<400> 309

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 310

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AL194

<400> 310

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Met Pro Leu Phe His Ala

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ile Pro Glu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 311

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AL195

<400> 311

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

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

<210> 312
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Phần kết nối

<400> 312
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 313
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Erbitux scFv HL

<400> 313

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr
 130 135 140

Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe
 145 150 155 160

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu
 180 185 190

Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 245

<210> 314

<211> 246

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Erbitux scFv LH

<400> 314

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

85

90

95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 115 120 125

Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser
 130 135 140

Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly
 145 150 155 160

Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Leu Gly
 165 170 175

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
 180 185 190

Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys
 195 200 205

Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 210 215 220

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ala
 245

<210> 315

<211> 246

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vectibix scFv

<400> 315

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 130 135 140

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn
 180 185 190

Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

195 200 205

Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr

210 215 220

Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu Ala Phe Gly Cys Gly

225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

<210> 316

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 x Erbitux scFv HL

<400> 316

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

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

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala
 530 535 540

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala
 545 550 555 560

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 595 600 605

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 610 615 620

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 625 630 635 640

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 660 665 670

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 675 680 685

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 690 695

<210> 317

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH71 x Erbitux scFv HL

<400> 317

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Gln Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 450 455 460

Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
 465 470 475 480

Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

Cys Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr
 500 505 510

Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys
 515 520 525

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala
 530 535 540

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala
 545 550 555 560

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 595 600 605

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

610 615 620
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 660 665 670
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 675 680 685
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 690 695

 <210> 318
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hu8C4 AH72 x Erbitux scFv HL

 <400> 318
 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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro
 50 55 60

Thr Pro Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

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

Cys Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr
500 505 510

Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys
515 520 525

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala
530 535 540

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala
545 550 555 560

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
595 600 605

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
610 615 620

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
625 630 635 640

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
660 665 670

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
675 680 685

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
690 695

<210> 319

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH73 x Erbitux scFv HL

<400> 319

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 450 455 460

Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
 465 470 475 480

Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

Cys Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr
 500 505 510

Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys
 515 520 525

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala
 530 535 540

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala
 545 550 555 560

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

580 585 590
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 595 600 605
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 610 615 620
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 660 665 670
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 675 680 685
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 690 695

<210> 320

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH85 x Erbitux scFv HL

<400> 320

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

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

Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
465 470 475 480

Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Cys Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr
500 505 510

Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys
515 520 525

Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala
530 535 540

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala
545 550 555 560

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
595 600 605

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
610 615 620

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
625 630 635 640

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
660 665 670

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 675 680 685

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 690 695

<210> 321

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 x Erbitux scFv LH

<400> 321

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu
 450 455 460

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 465 470 475 480

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser
 485 490 495

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
 500 505 510

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
 515 520 525

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn
 530 535 540

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

545 550 555 560
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 565 570 575
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
 580 585 590
 Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
 595 600 605
 Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys
 610 615 620
 Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
 625 630 635 640
 Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser
 645 650 655
 Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile
 660 665 670
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
 675 680 685
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 690 695

<210> 322

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH71 x Erbitux scFv LH

<400> 322

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro

210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 340 345 350
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu
450 455 460

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
465 470 475 480

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser
485 490 495

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
500 505 510

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
515 520 525

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn
530 535 540

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
545 550 555 560

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
580 585 590

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
595 600 605

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys
610 615 620

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
625 630 635 640

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser
 645 650 655

Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile
 660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
 675 680 685

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 690 695

<210> 323

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH72 x Erbitux scFv LH

<400> 323

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro
 50 55 60

Thr Pro Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu
450 455 460

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
465 470 475 480

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser
485 490 495

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
500 505 510

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile

515 520 525

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn
530 535 540

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
545 550 555 560

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
580 585 590

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
595 600 605

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys
610 615 620

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
625 630 635 640

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser
645 650 655

Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile
660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
675 680 685

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
690 695

<210> 324

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH73 x Erbitux scFv LH

<400> 324

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu
450 455 460

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
465 470 475 480

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser
485 490 495

Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
500 505 510

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
515 520 525

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn
530 535 540

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
545 550 555 560

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
580 585 590

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
595 600 605

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys
 610 615 620

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
 625 630 635 640

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser
 645 650 655

Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile
 660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
 675 680 685

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 690 695

<210> 325

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH85 x Erbitux scFv LH

<400> 325

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu
450 455 460

Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln
465 470 475 480

Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser

485 490 495
Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro
500 505 510

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
515 520 525

Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn
530 535 540

Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
545 550 555 560

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
580 585 590

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
595 600 605

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys
610 615 620

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
625 630 635 640

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser
645 650 655

Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile
660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
675 680 685

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
690 695

<210> 326

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 x Vectibix scFv

<400> 326

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Gly Asp Tyr Gly Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 340 345 350
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 450 455 460

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
 465 470 475 480

Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro
 485 490 495

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
 500 505 510

Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr
 515 520 525

Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 530 535 540

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp
 545 550 555 560

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 610 615 620

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 625 630 635 640

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 660 665 670

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu
 675 680 685

Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 690 695

<210> 327

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH71 x Vectibix scFv

<400> 327

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Ala Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

450 455 460
Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
465 470 475 480
Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro
 485 490 495
Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
 500 505 510
Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr
 515 520 525
Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 530 535 540
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp
545 550 555 560
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 565 570 575
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 595 600 605
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 610 615 620
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
625 630 635 640
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 660 665 670

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu
 675 680 685

Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 690 695

<210> 328

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH72 x Vectibix scFv

<400> 328

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Thr His Phe Ser Arg Ser Pro
 50 55 60

Thr Pro Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
450 455 460

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
465 470 475 480

Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro
485 490 495

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
500 505 510

Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr
515 520 525

Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
530 535 540

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp
 545 550 555 560

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 610 615 620

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 625 630 635 640

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 660 665 670

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu
 675 680 685

Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 690 695

<210> 329

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH73 x Vectibix scFv

<400> 329

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

420 425 430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
450 455 460
Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
465 470 475 480
Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro
485 490 495
Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
500 505 510
Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr
515 520 525
Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
530 535 540
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp
545 550 555 560
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
565 570 575
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
595 600 605
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
610 615 620
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
625 630 635 640

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 660 665 670

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu
 675 680 685

Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 690 695

<210> 330

<211> 699

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu8C4 AH85 x Vectibix scFv

<400> 330

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 Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Trp Gly Asn Ser His Val Val Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

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

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
450 455 460

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
465 470 475 480

Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro
485 490 495

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
500 505 510

Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr
515 520 525

Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
530 535 540

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp
545 550 555 560

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
610 615 620

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
625 630 635 640

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
660 665 670

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu
675 680 685

Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
690 695

<210> 331

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng quyết định kháng nguyên Y321~L329

<400> 331

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu

1 5

<210> 332

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng quyết định kháng nguyên I333~I341

<400> 332

Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp Ile

1 5

<210> 333

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng quyết định kháng nguyên P366~D372

<400> 333

Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp

1 5

<210> 334

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng quyết định kháng nguyên Q464~S474

<400> 334

Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr

1 5 10

<210> 335

<211> 1390

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tham khảo c-Met

<400> 335

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys

20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala

35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu

50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys

65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe

85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln

515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925

Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala
930 935 940

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln
945 950 955 960

Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His
965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr
980 985 990

Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro
995 1000 1005

Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val
1010 1015 1020

Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser
1025 1030 1035 1040

Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser
1045 1050 1055

Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly
1060 1065 1070

Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His
1075 1080 1085

Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys
1090 1095 1100

Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu
1105 1110 1115 1120

Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His
1125 1130 1135

Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser
1140 1145 1150

Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe

1155	1160	1165
Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe		
1170	1175	1180
Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe		
1185	1190	1195 1200
Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe		
1205	1210	1215
Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys		
1220	1225	1230
Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys		
1235	1240	1245
Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser		
1250	1255	1260
Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly		
1265	1270	1275 1280
Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu		
1285	1290	1295
Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu		
1300	1305	1310
Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro		
1315	1320	1325
Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe		
1330	1335	1340
Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys		
1345	1350	1355 1360
Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp		
1365	1370	1375

Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1380 1385 1390