



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

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

(11)



1-0043620

(51)^{2020.01} C07K 16/30; C12N 15/13; A61K
39/395; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2021-06044

(22) 31/03/2020

(86) PCT/CN2020/082369 31/03/2020

(87) WO2020/200196 08/10/2020

(30) 201910257853.6 01/04/2019 CN

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/01/2022 406A

(73) 1. JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone,
Lianyungang, Jiangsu 222047, China

2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

No. 279 Wenjing Road, Minhang District, Shanghai, 200245, China

(72) YANG, Yang (CN); GE, Hu (CN); TAO, Weikang (CN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CLAUDIN 18.2, THỂ TIẾP HỢP, DƯỢC PHẨM VÀ KIT
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2021-06044

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Claudin 18.2 và ứng dụng của nó. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Claudin 18.2; kháng thể có nguồn gốc từ chuột, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và đoạn gắn kết với kháng nguyên của chúng mà chứa CDR của kháng thể kháng Claudin 18.2. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến thể tiếp hợp, dược phẩm và kit chứa kháng thể này.

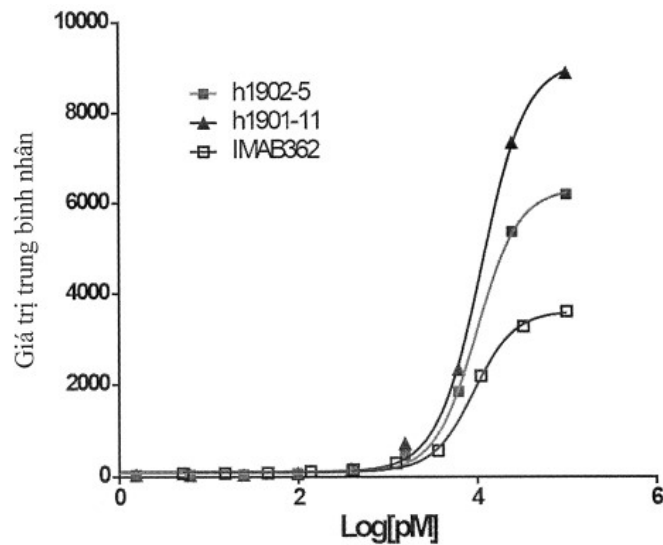


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực thuốc kháng thể. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Claudin 18.2 và ứng dụng của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các mô tả ở đây chỉ đề cập đến thông tin cơ bản về sáng chế, và không nhất thiết tạo nên giải pháp kỹ thuật đã biết.

Claudin-18 (CLDN18) là một protein được mã hóa bởi gen Claudin18 của người và thuộc họ protein liên kết chặt chẽ trong tế bào. Claudin-18 có thể kiểm soát dòng phân tử giữa các lớp tế bào.

Protein Claudin-18 xét về mặt cấu trúc bao gồm bốn vùng xuyên màng và hai vòng ngoại bào, với đầu N và đầu C nằm bên trong tế bào chất. Claudin-18 có hai biến thể ghép nối, Claudin 18.1 và Claudin 18.2. Hai trình tự này chỉ khác nhau ở 8 axit amin ở vòng ngoại bào thứ nhất. Claudin 18.1 được biểu hiện và được phân bố khác so với Claudin 18.2. Claudin 18.1 được biểu hiện chọn lọc ở các tế bào phổi bình thường, trong khi đó sự biểu hiện của Claudin 18.2 bị giới hạn chủ yếu ở các tế bào bình thường, song thường được hoạt hóa lạc vị và biểu hiện quá mức ở nhiều khối u (ung thư dạ dày, ung thư phổi, ung thư tuyến tụy, v.v.). Claudin 18.2 được coi là một đích điều trị tiềm năng đối với ung thư dạ dày và các loại ung thư khác. Việc phát hiện ra đích này cũng đem lại một lựa chọn mới để điều trị bệnh ung thư dạ dày.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Claudin 18.2.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3

giống như các trình tự trong vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự LCDR1, LCDR2, và LCDR3 giống như các trình tự trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4; hoặc

ii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 giống như các trình tự trong vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự LCDR1, LCDR2, và LCDR3 giống như các trình tự trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6. Theo một vài phương án, kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

iii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong NO: 12, SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, tương ứng; hoặc

iv) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng các số mục, như i), ii), a), b), v.v., chỉ nhằm mục đích đưa ra các giải pháp kỹ thuật hoặc các yếu tố được liệt kê rõ ràng hơn và được xác định một cách dễ dàng, nhưng không giới hạn ở các giải pháp hoặc các yếu tố sau theo khía cạnh bất kỳ. Nếu số mục như vậy được sử dụng, không có nghĩa là các giải pháp kỹ thuật hoặc các yếu tố sau đó phải giống như vậy.

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, kháng thể kháng Claudin 18.2 là kháng thể chuột, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(v) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, 100% tương đồng với vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 hoặc 24, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 hoặc 21; hoặc

(vi) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc 31, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc 28.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(1) trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 3, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 4;

(2) trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 24 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 24, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 21;

(3) trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 5, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 6; hoặc

(4) trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 31, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 28 hoặc có ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 28.

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, kháng thể kháng Claudin 18.2 là kháng thể được làm tương thích với người, và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung có nguồn gốc từ vùng khung của kháng thể người hoặc biến thể vùng khung của nó, và biến

thể vùng khung có nhiều nhất 10 đột biến ngược trên mỗi vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người.

Theo một vài phương án, vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người là giống như vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin SEQ ID NO:24, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể người là giống vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin SEQ ID NO:21; hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người là giống như vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin SEQ ID NO:31, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể người là giống như vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin SEQ ID NO:28.

Theo một vài phương án, tốt hơn là, biến thể vùng khung bao gồm (các) đột biến được chọn từ mục (a) hoặc (b) dưới đây:

(a) một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin gồm 22S, 85I hoặc 87H được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và/hoặc một hoặc nhiều đột biến ngược được chọn từ nhóm bao gồm 48I, 82T và 69M được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng; hoặc

(b) một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 4L và 22S được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và/hoặc một hoặc nhiều đột biến ngược được chọn từ nhóm bao gồm 38K, 40R, 48I, 66K, 67A, 69, 71L và 73K được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng.

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, biến thể vùng khung bao gồm (các) đột biến được chọn từ mục (a-1) hoặc (b-1) dưới đây:

(a-1) các đột biến ngược axit amin 22S, 85I và 87H được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và các đột biến ngược axit amin 48I và 82T được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng; hoặc

(b-1) đột biến ngược axit amin 4L được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, trong đó:

(vii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4; hoặc

(viii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 24, 25, 26 hoặc 27 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, 22 hoặc 23; hoặc

(ix) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6; hoặc

(x) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 31, 32, 33 hoặc 34 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 28, 29 hoặc 30;

Theo một vài phương án về kháng thể kháng thể kháng Claudin18.2 như được mô tả trên đây, kháng thể kháng Claudin18.2 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện dưới đây:

(xi) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 31 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 29; hoặc

(xii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 23.

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng có thể là một dạng kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 1. Các dạng kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1901

Vùng biến đổi	VH1	VH2	VH3	VH4
VL1	VH1VL1	VH2VL1	VH3VL1	VH4VL1
VL2	VH1VL2	VH2VL2	VH3VL2	VH4VL2

VL3	VH1VL3	VH2VL3	VH3VL3	VH4VL3
-----	--------	--------	--------	--------

Bảng 2. Các dạng kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1902

Vùng biến đổi	VH11	VH12	VH13	VH14
VL11	VH11VL11	VH12VL11	VH13VL11	VH14VL11
VL12	VH11VL12	VH12VL12	VH13VL12	VH14VL12
VL13	VH11VL13	VH12VL13	VH13VL13	VH14VL13

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, kháng thể còn bao gồm (các) vùng cố định của kháng thể. Theo một số phương án cụ thể, vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm (các) vùng cố định của IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 của người và (các) biến thể của chúng, và vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm (các) vùng cố định của chuỗi kappa, lambda của kháng thể người và (các) biến thể của chúng. Theo một số phương án cụ thể, kháng thể bao gồm trình tự vùng cố định chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án cụ thể, kháng thể bao gồm chuỗi nặng có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 35 hoặc 42, và chuỗi nhẹ có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 36 hoặc 39; hoặc

chuỗi nặng có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 37 hoặc 49, và/hoặc chuỗi nhẹ có ít nhất 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% tương đồng với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 38 hoặc 46.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây bao gồm:

(c) chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 35 và/hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 36;

(d) chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 42, 43, 44 hoặc 45 và/hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 39, 40 hoặc 41;

(e) chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 37 và/hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 38; hoặc

(f) chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 49, 50, 51 hoặc 52 và/hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 46, 47 hoặc 48.

Theo một vài phương án về kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, kháng thể cạnh tranh với kháng thể kháng Claudin 18.2 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây để gắn kết với Claudin 18.2 của người.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây bao gồm:

chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 44, và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 41; hoặc

chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 49, và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 47.

Theo một khía cạnh khác sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây.

Một khía cạnh khác của sáng chế cũng đề cập đến vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây.

Một khía cạnh khác của sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ, mà chứa phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây hoặc vector biểu hiện như được mô tả trên đây, tốt hơn là tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú.

Một khía cạnh khác của sáng chế còn đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, mà được tạo thành bằng cách tiếp hợp kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây với dược chất gây độc tế bào.

Một khía cạnh khác của sáng chế còn đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, chứa hoặc bao gồm kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây liên kết cộng hóa trị với dược chất gây độc tế bào.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng

thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể tiếp hợp kháng thể kháng Claudin 18.2-được chất như được mô tả trên đây.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến được phẩm, chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất như được mô tả trên đây, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, dung dịch đệm hoặc tá được được dụng.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp thử nghiệm miễn dịch hoặc phát hiện Claudin18.2, bao gồm bước cho kháng thể kháng Claudin18.2 nêu trên tiếp xúc với mẫu cần thử nghiệm.

Theo một vài phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây để sản xuất chất dùng cho thử nghiệm miễn dịch Claudin18.2 của người.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây dùng cho thử nghiệm miễn dịch hoặc phát hiện Claudin18.2.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến kit chứa kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất như được mô tả trên đây, hoặc được phẩm như được mô tả trên đây, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư hoặc khối u, trong đó bệnh ung thư hoặc khối u tốt hơn là là bệnh ung thư hoặc khối u ác tính dương tính với Claudin18.2, tốt hơn nữa là bệnh ung thư tế bào vảy ở đầu và cổ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, caxinôm họng thanh quản, ung thư mũi họng, ung thư thực quản, ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư gan, u tế bào gan, caxinôm tế bào gan, ung thư gan và túi mật, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày đường ruột, ung thư ruột, ung thư đại tràng, ung thư

đại trực tràng, ung thư thận, caxinôm thận tế bào sáng, ung thư buồng trứng, ung thư màng trong tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư da, u melanin, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư xương, sacôm sụn, u tủy, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u tăng sinh tủy xương, ung thư tế bào vảy, Sacôm Ewing, chứng thoái hóa dạng tinh bột chuỗi nhẹ toàn thân và ung thư tế bào Merkel; u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho thể nang, u lympho tế bào B lớn trung mô nguyên phát, u lympho tế bào vỏ đại não, u lympho dòng lympho bào nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu tế bào T/mô bào, và u tương bào lympho; ung thư phổi được chọn từ nhóm bao gồm: ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ; và bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dạng tủy mạn tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho, bệnh bạch cầu lympho bào, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, và bệnh bạch cầu dạng tủy.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh có liên quan đến Claudin 18.2, trong đó phương pháp này bao gồm cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất như được mô tả trên đây, hoặc được phẩm như được mô tả trên đây, trong đó tốt hơn là bệnh này là bệnh ung thư hoặc khối u; tốt hơn nữa là bệnh ung thư hoặc khối u ác tính dương tính với Claudin 18.2, tốt hơn nữa là được chọn từ nhóm bao gồm ung thư tế bào vảy ở đầu và cổ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, caxinôm họng thanh quản, ung thư mũi họng, ung thư thực quản, ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư gan, u tế bào gan, caxinôm tế bào gan, ung thư gan và túi mật, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày đường ruột, ung thư ruột, ung thư đại tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư thận, caxinôm thận tế bào sáng, ung thư buồng trứng, ung thư màng trong tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư da, u melanin, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư xương, sacôm sụn, u tủy, đa u

tủy, hội chứng loạn sản tủy, u tăng sinh tủy xương, ung thư tế bào vảy, sacôm Ewing, chứng thoái hóa dạng tinh bột chuỗi nhẹ toàn thân và ung thư tế bào Merkel. Tốt hơn nữa là, u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho thể nang, u lympho tế bào B lớn trung mô nguyên phát, u lympho tế bào vỏ đại não, u lympho dòng lympho bào nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu tế bào T/mô bào, và u tương bào lympho; ung thư phổi được chọn từ nhóm bao gồm: ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ; và bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dạng tủy mạn tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho, bệnh bạch cầu lympho bào, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, và bệnh bạch cầu dạng tủy.

Theo một vài phương án, lượng hữu hiệu để điều trị được dùng để chỉ 0,1 mg đến 3000 mg hoặc 1 mg đến 1000 mg kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất như được mô tả trên đây được bao gồm trong dạng liều đơn vị của dược phẩm.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Claudin 18.2 như được mô tả trên đây, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất như được mô tả trên đây hoặc dược phẩm như được mô tả trên đây, dùng để điều trị bệnh có liên quan đến Claudin 18.2, trong đó tốt hơn là bệnh này là bệnh ung thư hoặc khối u; tốt hơn nữa là bệnh ung thư hoặc khối u ác tính dương tính với Claudin 18.2, tốt hơn nữa là được chọn từ nhóm bao gồm ung thư tế bào vảy ở đầu và cổ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, caxinôm họng thanh quản, ung thư mũi họng, ung thư thực quản, ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư gan, u tế bào gan, caxinôm tế bào gan, ung thư gan và túi mật, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày đường ruột, ung thư ruột, ung thư đại tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư thận, caxinôm thận tế bào sáng, ung thư buồng trứng, ung thư màng trong tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư da, u melanin, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư xương, sacôm sụn, u tủy, đa u

tủy, hội chứng loạn sản tủy, u tăng sinh tủy xương, ung thư tế bào vảy, sacôm Ewing, chứng thoái hóa dạng tinh bột chuỗi nhẹ toàn thân và ung thư tế bào Merkel. Tốt hơn nữa là, u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho thể nang, u lympho tế bào B lớn trung mô nguyên phát, u lympho tế bào vỏ đại não, u lympho dòng lympho bào nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu tế bào T/mô bào, và u tương bào lympho; ung thư phổi được chọn từ nhóm bao gồm: ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ; và bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dạng tủy mạn tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho, bệnh bạch cầu lympho bào, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, và bệnh bạch cầu dạng tủy.

Theo một vài phương án, bệnh ung thư này là ung thư dạ dày, ung thư thực quản, ung thư phổi hoặc ung thư tuyến tụy.

Theo một vài phương án, kháng thể hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có thể như được mô tả trên đây đóng một vai trò điều trị đối với các bệnh ung thư có mức biểu hiện Claudin 18.2 cao, trung bình và thấp như được mô tả trên đây.

Kháng thể Claudin 18.2 và thể tiếp hợp kháng thể-dược chất đề cập trong sáng chế có ái lực rất tốt với các kháng nguyên trên bề mặt tế bào, hiệu quả nhập bào thích hợp, hiệu quả ức chế khối u mạnh, và phổ ứng dụng bào chế rộng hơn, và thích hợp để sử dụng trong lâm sàng làm thuốc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: thể hiện các kết quả thử nghiệm FACS của việc gắn kết các kháng thể được làm tương thích với người với Claudin 18.2 của người ở cấp độ tế bào.

Fig.2: thể hiện thử nghiệm nhập bào của các kháng thể được làm tương thích với người ở các tế bào NUGC4.

Fig.3A đến Fig.3C: thể hiện việc phát hiện ra tác dụng ADCC của các kháng thể ở các tế bào NUGC4 với các mức biểu hiện Claudin 18.2 khác nhau. Fig.3A thể hiện việc phát hiện ra tác dụng ADCC của các kháng thể đến các tế bào NUGC4 kiểu đại (với mức biểu hiện Claudin18.2 thấp); Fig.3B thể hiện việc phát hiện tác dụng ADCC của các kháng thể đến các tế bào NUGC4 có mức biểu hiện

Claudin18.2 trung bình; Fig.3C thể hiện việc phát hiện ra tác dụng ADCC của các kháng thể đến các tế bào NUGC4 có mức biểu hiện Claudin18.2 cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ

Để hiểu dễ hơn về sáng chế, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật nhất định được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác ở đây, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các mã ba chữ cái và một chữ cái dùng cho các axit amin được sử dụng trong sáng chế là như được mô tả trong tài liệu J. biol. chem, 243, p3558 (1968).

Thuật ngữ "dược chất gây độc tế bào" được dùng để chỉ một chất mà ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của các tế bào và/hoặc dẫn đến sự chết hoặc phá vỡ tế bào. Dược chất gây độc tế bào có liên quan đến các hợp chất mà có thể được sử dụng để giết tế bào, như các độc tố, các chất hóa trị liệu và các chất khác.

Thuật ngữ "độc tố" được dùng để chỉ chất bất kỳ có khả năng tạo ra các tác dụng có hại đến sự phát triển hoặc sự tăng sinh của tế bào, và chất này có thể là độc tố phân tử nhỏ và dẫn xuất của nó từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, kể cả các dẫn xuất camptothecin như exatecan, maytansinoid và các dẫn xuất của chúng (CN101573384) như DM1, DM3, DM4, Orlistatin F (AF) và các dẫn xuất của chúng, như MMAF, MMAE, 3024 (WO 2016/127790 A1, hợp chất 7), độc tố bạch hầu, ngoại độc tố, chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, modeccin, α -sarcin, protein gây độc có nguồn gốc từ *Aleutites fordii*, protein gây độc dianthin, protein gây độc có nguồn gốc từ *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII và PAP-S), chất ức chế *Momordica charantia*, curxin, crotin, chất ức chế *Saponaaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và trichothexen.

Thuật ngữ "dược chất hóa trị liệu" là một hợp chất mà có thể được sử dụng để điều trị các khối u. Định nghĩa này cũng bao gồm các chất chống hormone có khả năng điều biến, làm giảm, phong bế hoặc ức chế các tác dụng hormone mà có thể thúc đẩy sự phát triển bệnh ung thư và nói chung ở dạng liệu pháp toàn thân. Bản thân chúng có thể là các hormone. Ví dụ về các dược chất hóa trị liệu bao gồm các

chất alkyl hóa, như thiotepa; xyclophamit (CYTOXAN™); Alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benadopa, carboquon, meturedopa và uredopa; aziridin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylen phosphoramit, trietylen thiophosphoramit và trimetylolomelamin; mù tạc nitơ như clorambuxil, chlornaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamid, mecloretamin, mecloetaminoxit; melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, uramustin; nitrosurea như carmustin, clorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các chất kháng sinh như clarithromyxin, actinomycin, anthramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, calicheamixin, carabixin, chromomycin, carzinophilin, chromomycin, actinomycin D, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxy-L-norleuxin, doxorubixin, epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomycin, mitomycin, axxit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin; streptozoxin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất chống chuyển hóa như methotrexat, 5-FU; các chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; chất tương tự methotrexat như fludarabin, 6-mercaptopterin, thiomethopterin, thioguanopterin; chất tương tự pyrimidin như ancitabin, azacitidin, 6-azuridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxituluridin, enocitabin, fluorouridin, 5-FU; các androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; các chất kháng adrenergic như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; các chất bổ sung axit folic như axit frolinic; glucuron; aldophosphamitglycosit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabucil; biasntren; edatraxat; defofamin; colchixin; diaziqun; elfomithin; elliptinium axetat; etoglucid; gallium nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pintostatin; phenamet; pirarubixin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK®; razoxan; sizofiran; spirogermanium; axit keto có nguồn gốc từ *Alternaria tenuis*; triimin quinon; 2,2',2''-trichlorotrietylamin; uretan; vinblastin amit; dacarbazin; mù tạc manitol; mitobronitol; rượu dibromo euonymus; pipobroman; gacytosin; arabinosit ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; taxan như paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) và docetaxel (TAXOTERE®,

Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambuxil; gemxitabin; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; chất tương tự platin như cisplatin và carboplatin; vinblastin; platin; etoposit (VP-16); ifosphat; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposit; daunorubixin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS2000; Difluorometylnithin (DMFO); esperamixin của axit retinoic; capecitabin; và các muối được dùng, các axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất nêu trên. Định nghĩa này cũng bao gồm các chất chống hormone mà có thể điều biến hoặc ức chế tác dụng của hormone lên khối u. Ví dụ, các chất kháng estrogen bao gồm tamoxifen, raloxifen, chất ức chế aromataza 4(5)-imidazol, 4-hydroxyl tamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và toremifen (Fareston); và các chất kháng androgen như flutamat, nilutamat, bicalutamat, leuprolide và goserelin; và các muối được dùng, các axit hoặc các dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất nêu trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" được dùng để chỉ globulin miễn dịch, và kháng thể đầy đủ là một cấu trúc gồm bốn chuỗi peptit được tạo thành bởi hai chuỗi nặng giống nhau được nối với hai chuỗi nhẹ giống nhau nhờ (các) liên kết disulfua liên chuỗi. Các vùng cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch có cách sắp xếp và các thành phần axit amin khác nhau, nhờ đó thể hiện tính kháng nguyên khác nhau. Do đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại, hoặc được đặt tên là các isotyp globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, và các chuỗi nặng tương ứng là μ , δ , γ , α và ϵ , tương ứng. Tùy theo thành phần axit amin của vùng bản lề và số và vị trí của các liên kết disulfua chuỗi nặng, loại Ig này có thể còn được chia tiếp thành các typ phụ khác, ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc λ dựa trên các vùng cố định khác nhau. Mỗi loại trong số năm loại Ig có thể có chuỗi kappa hoặc chuỗi lamda.

Khoảng 110 trình tự axit amin liền kề với đầu N của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có thể thay đổi mạnh, được biết đến là các vùng biến đổi (các vùng Fv); phần còn lại của các trình tự axit amin gần với đầu C là tương đối ổn định, được biết đến là các vùng cố định. Vùng biến đổi này bao gồm 3 vùng siêu biến (hypervariable region-HVR) và 4 vùng khung (framework region-FR) với các

trình tự tương đối bảo toàn. Ba vùng siêu biến mà quyết định tính đặc hiệu của kháng thể cũng được biết đến là các vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining region-CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, với thứ tự liên tiếp từ đầu amino đến đầu carboxyl theo trình tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Ba vùng CDR của chuỗi nhẹ được dùng để chỉ LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và ba vùng CDR của chuỗi nặng được dùng để chỉ HCDR1, HCDR2, và HCDR3.

Các kháng thể theo sáng chế bao gồm các kháng thể chuột, kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể chuột" được dùng để chỉ các kháng thể đơn dòng kháng Claudin18.2 của người được sản xuất theo kiến thức và kỹ năng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong quá trình sản xuất, đối tượng thử nghiệm được tiêm Claudin18.2 hoặc epitop của nó như là một kháng nguyên, và sau đó tế bào lai biểu hiện kháng thể mà có trình tự hoặc các đặc tính chức năng mong muốn được phân lập. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể Claudin18.2 của chuột hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của chúng, hoặc còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 của chuột hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể khảm", là kháng thể thu được bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể chuột với vùng cố định của kháng thể người, và kháng thể như vậy có thể làm giảm đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi kháng thể chuột. Để tạo ra kháng thể khảm, trước hết, cần tạo ra một tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu của chuột và gen của vùng biến đổi được tách dòng từ tế bào lai của chuột. Gen của vùng cố định được tách dòng từ kháng thể người nếu cần. Gen vùng biến đổi của chuột được nối với gen của vùng cố định của người để tạo thành gen khảm, mà sau đó có thể được cài vào vectơ biểu hiện. Cuối cùng phân tử kháng thể khảm sẽ được biểu hiện trong hệ có nhân thực hoặc hệ nhân sơ. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, chuỗi nhẹ kháng thể của kháng thể khảm còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi kappa, lambda của người hoặc biến thể của nó. Chuỗi nặng kháng thể của kháng thể khảm kháng Claudin18.2 còn bao gồm

vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 với (các) đột biến axit amin (như đột biến L234A và/hoặc L235A, và/hoặc đột biến S228P).

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", cũng được biết đến là kháng thể được ghép CDR, được dùng để chỉ kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR không phải của người vào các khung vùng biến đổi của kháng thể người, tức là, kháng thể được tạo ra dưới dạng các loại trình tự khung khác nhau của kháng thể dòng mầm của người. Các kháng thể được làm tương thích với người có thể tránh được các đáp ứng khác loại được gây ra bởi các kháng thể khảm mà mang một lượng lớn các thành phần protein khác loại. Các trình tự khung như vậy có thể thu được từ cơ sở dữ liệu ADN công cộng gồm các trình tự gen của kháng thể dòng mầm hoặc các nguồn tài liệu tham khảo đã công bố. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm của các gen vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (có trên trang web www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), cũng như là trong tài liệu Kabat, EA, et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Để tránh việc làm giảm hoạt tính do tính sinh miễn dịch giảm, các trình tự khung trong vùng biến đổi của kháng thể người có thể được tiến hành các đột biến đảo hoặc đột biến ngược ở mức tối thiểu để duy trì hoạt tính. Các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế cũng được dùng để chỉ các kháng thể được làm tương thích với người mà được tiến hành làm trưởng thành ái lực CDR nhờ biểu hiện qua nấm men.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ thu được từ chuỗi κ , λ của người hoặc của chuột hoặc biến thể của chúng, hoặc chứa thêm vùng cố định chuỗi nặng thu được từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người hoặc của chuột hoặc biến thể của nó; tốt hơn là bao gồm vùng cố định chuỗi nặng thu được từ IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc biến thể IgG1, IgG2 hoặc IgG4 với (các) đột biến axit amin (như đột biến L234A và/hoặc L235A, và/hoặc đột biến S228P).

Như được mô tả ở đây, "các biến thể" của vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể người được dùng để chỉ các biến thể vùng cố định

chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được bộc lộ trong giải pháp kỹ thuật đã biết mà không bị thay đổi về cấu trúc và chức năng của các vùng biến đổi của kháng thể. Các biến thể được lấy làm ví dụ bao gồm các biến thể vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 được tạo ra bằng cách thao tác di truyền trực tiếp vị trí và thay thế axit amin trên vùng cố định chuỗi nặng. Các thay thế cụ thể là, ví dụ, đột biến YTE, đột biến L234A và/hoặc L235A, đột biến S228P, và/hoặc các đột biến có liên quan đến cấu trúc nướm trong lỗ (tạo ra chuỗi nặng kháng thể có sự kết hợp của nướm-Fc và lỗ-Fc). Các đột biến này đã được chứng minh là tạo ra kháng thể với các đặc tính mới, mà không làm thay đổi chức năng của vùng biến đổi của kháng thể.

"Kháng thể người (HuMAb)", "kháng thể thu được từ người", "kháng thể người đầy đủ" và "kháng thể người trọn vẹn" được sử dụng thay thế cho nhau, và có thể là các kháng thể thu được từ người hoặc các kháng thể thu được từ sinh vật biến đổi di truyền mà "đã được thao tác di truyền" nhờ phương pháp đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này để sản xuất các kháng thể người đặc hiệu đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. Ở một số kỹ thuật, các yếu tố locut chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người được đưa vào các chủng tế bào thu được từ các dòng tế bào gốc phôi, trong đó locut chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nội sinh được hướng đích để phá vỡ. Các sinh vật chuyển gen này có thể tổng hợp các kháng thể người đặc hiệu với các kháng nguyên của người, và các sinh vật có thể được sử dụng để tạo ra các tế bào lai mà tiết ra các kháng thể người. Kháng thể người cũng có thể là các kháng thể trong đó các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bởi các trình tự nucleotit thu được từ một hoặc nhiều nguồn ADN của người. Các kháng thể đầy đủ của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp chuyển nhiễm gen hoặc nhiễm sắc thể và công nghệ biểu hiện thực khuẩn thể, hoặc được tạo ra từ các tế bào B được hoạt hóa *in vitro*, tất cả các kỹ thuật này đều đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn" và "kháng thể trọn vẹn" được sử dụng thay đổi cho nhau ở đây và được dùng để chỉ kháng thể ở dạng gần như đầy đủ, khi được phân biệt với các đoạn gắn kết với kháng nguyên nêu dưới đây. Cụ thể là, thuật ngữ này được dùng để chỉ các kháng thể chứa các vùng cố định ở các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Thuật ngữ "kháng thể" theo sáng chế bao gồm "các kháng thể có chiều dài đầy đủ" và các đoạn gắn

kết với kháng nguyên của chúng.

Theo một vài phương án, kháng thể có chiều dài đầy đủ theo sáng chế bao gồm các kháng thể có chiều dài đầy đủ được tạo thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng cố định chuỗi nhẹ, và liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nặng, như được thể hiện ở dạng kết hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong bảng dưới đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể chọn lọc vùng cố định chuỗi nhẹ và vùng cố định chuỗi nặng từ các nguồn kháng thể khác nhau theo nhu cầu thực tế, như vùng cố định chuỗi nhẹ và vùng cố định chuỗi nặng thu được từ kháng thể người.

Thuật ngữ "đoạn gắn kết với kháng nguyên" hoặc "đoạn chức năng" được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn kháng thể mà vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, Claudin18.2). Đã được thể hiện rằng các đoạn của kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể được sử dụng để đạt được chức năng gắn kết với kháng nguyên. Ví dụ về các đoạn gắn kết được bao hàm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết với kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) đoạn Fab, đoạn đơn giá chứa các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) đoạn $F(ab')_2$, đoạn hai giá được tạo thành bởi hai đoạn Fab được nối với nhau bằng cầu nối disulfua ở vùng bản lề, (iii) đoạn Fd bao gồm các miền VH và CH1; (iv) đoạn Fv bao gồm các miền VH và VL của một nhánh của kháng thể; (v) dsFv, đoạn gắn kết với kháng nguyên được tạo thành bởi VH và VL thông qua các liên kết disulfua liên chuỗi; và (vi) diabody, kháng thể đặc hiệu kép và kháng thể đa đặc hiệu chứa các đoạn như scFv, dsFv, và Fab. Ngoài ra, miền VL và miền VH của đoạn Fv được liên kết nhờ yếu tố liên kết tổng hợp để tạo ra chuỗi protein đơn, mà là một phân tử đơn giá được tạo thành bằng cách liên kết miền VL và VH (được dùng để chỉ là Fv chuỗi đơn (scFv); xem tài liệu ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; và Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết với kháng nguyên" của sáng chế. Các đoạn kháng thể như vậy được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được sàng lọc các đoạn chức năng bằng cách sử dụng phương pháp như phương pháp được áp dụng cho kháng thể nguyên vẹn. Các phần gắn kết với kháng nguyên có thể được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách

phá vỡ nhờ enzyme hoặc nhờ phương pháp hóa học globulin miễn dịch nguyên vẹn. Các kháng thể có thể ở dạng các isotyp khác nhau, ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, typ phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Fab là một đoạn kháng thể có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên được tạo ra bằng cách xử lý phân tử kháng thể IgG bằng enzyme có hoạt tính giống như papain.

$F(ab')_2$ là một đoạn kháng thể có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên được tạo ra bằng cách phân cắt IgG bằng enzyme có hoạt tính giống như pepsin.

Fab' là một đoạn kháng thể có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên được tạo ra bằng cách phân cắt $F(ab')_2$ nêu trên.

Ngoài ra, Fab' có thể được tạo ra bằng cách chèn ADN mã hóa đoạn Fab' vào vector biểu hiện, và đưa vector này vào tế bào chủ.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn", "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" được dùng để chỉ phân tử chứa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (hoặc vùng; VH) được liên kết với miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc vùng; VL) nhờ yếu tố liên kết. Các phân tử scFv như vậy có cấu trúc chung là NH_2 -VL-yếu tố liên kết-VH-COOH hoặc NH_2 -VH-yếu tố liên kết-VL-COOH. Các yếu tố liên kết khác có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong các tài liệu sau, như nhưng không chỉ giới hạn ở: Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731; Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106; Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061; Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 và Roovers et al. (2001), Cancer Immunol.

Diabody là một đoạn kháng thể trong đó scFv hoặc Fab được dime hóa, và nó là đoạn kháng thể có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên hai giá. Đối với hoạt tính gắn kết với kháng nguyên hai giá, hai kháng nguyên có thể giống nhau hoặc khác nhau.

Kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu được dùng để chỉ kháng thể có thể gắn kết với hai hoặc nhiều kháng nguyên hoặc các quyết định kháng nguyên.

dsFv được tạo ra bằng cách thay thế một gốc axit amin trong mỗi VH và VL bằng gốc cysteine, và sau đó liên kết các peptit đã thay thế bằng liên kết disulfua giữa hai gốc cysteine. Các gốc axit amin được thế bằng gốc cysteine có thể được chọn

dựa vào dự đoán cấu trúc ba chiều của kháng thể theo các phương pháp đã biết (ví dụ, Protein Engineering, 7, 697 (1994)).

Thuật ngữ "khác biệt axit amin" hoặc "đột biến axit amin" được dùng để chỉ các thay đổi axit amin hoặc các đột biến axit amin trong protein hoặc biến thể polypeptit so với protein hoặc polypeptit ban đầu, bao gồm 1, 2, 3 hoặc nhiều hơn 3 axit amin thêm, mất hoặc thay thế trên cơ sở protein hoặc polypeptit ban đầu.

Thuật ngữ "khung kháng thể" hoặc "vùng FR" được dùng để chỉ một phần của miền biến đổi, VL hoặc VH, mà dùng làm giàn giáo cho các vòng gắn kết với kháng nguyên (CDR) của miền biến đổi này. Về cơ bản, đây là miền biến đổi không có các CDR.

Thuật ngữ "vùng quyết định bổ trợ", "CDR" hoặc "vùng siêu biến" được dùng để chỉ một trong số sáu vùng siêu biến có mặt ở miền biến đổi của kháng thể mà chủ yếu góp phần vào sự gắn kết với kháng nguyên. Nói chung, có ba CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3) ở mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng, và ba CDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3) ở mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Ranh giới trình tự axit amin của các CDR có thể được xác định bằng sơ đồ bất kỳ trong số nhiều sơ đồ đã biết, kể cả tiêu chí đánh số "Kabat" (xem tài liệu Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), tiêu chí đánh số "Chothia" (xem tài liệu Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273:927-948) và tiêu chí đánh số ImmunoGenTics (IMGT) (Lefranc MP, Immunologist, 7, 132- 136 (1999); Lefranc, MP, etc., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003), và tiêu chí khác. Ví dụ, đối với dạng cổ điển, theo tiêu chí Kabat, các gốc axit amin của CDR ở miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được đánh số là 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3); và các gốc axit amin CDR ở miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được đánh số là 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), và 89-97 (LCDR3). Theo tiêu chí Chothia, các gốc axit amin CDR trong VH được đánh số là 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3); và các gốc axit amin trong VL được đánh số là 26-32 (LCDR1), 50- 52 (LCDR2) và 91-96 (LCDR3). Bằng cách kết hợp cả Kabat và Chothia để xác định các CDR, các CDR bao gồm các gốc axit amin 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3) ở VH của người và các gốc axit amin 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) và 89-97

(LCDR3) ở VL của người. Theo tiêu chí IMGT, các gốc axit amin CDR trong VH được đánh số đại thể là 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) và 93-102 (CDR3), và các gốc axit amin CDR trong VL được đánh số đại thể là 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) và 89-97 (CDR3). Theo tiêu chí IMGT, các vùng CDR của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình IMGT/DomainGap Align.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "quyết định kháng nguyên" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn kết vào (ví dụ, vị trí đặc hiệu trên phân tử Claudin18.2). Các epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liên kề hoặc không liên kề ở cấu hình bậc ba duy nhất. Xem tài liệu, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996).

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu với", "gắn kết chọn lọc với", "gắn kết chọn lọc" hoặc "gắn kết đặc hiệu" được dùng để chỉ việc gắn kết kháng thể với epitop tiền định trên kháng nguyên. Thông thường, kháng thể gắn kết với ái lực (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, ví dụ, nhỏ hơn khoảng 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M hoặc thậm chí nhỏ hơn nữa.

Thuật ngữ "KD" được dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Nói chung, kháng thể theo sáng chế gắn kết với claudin 18.2 hoặc epitop của nó với hằng số phân ly cân bằng (KD) nhỏ hơn 10^{-7} M, ví dụ, nhỏ hơn 10^{-8} M hoặc 10^{-9} M, ví dụ, ái lực của kháng thể theo sáng chế với kháng nguyên trên bề mặt tế bào được xác định bằng cách đo giá trị KD bằng phương pháp FACS.

Khi thuật ngữ "cạnh tranh" được sử dụng trong bối cảnh các protein gắn kết với kháng nguyên mà cạnh tranh để gắn kết với cùng một epitop, thì thuật ngữ này có nghĩa là sự cạnh tranh xảy ra giữa các protein gắn kết với kháng nguyên, mà được xác định bằng các thử nghiệm trong đó protein gắn kết với kháng nguyên cần thử nghiệm (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó) ngăn ngừa hoặc ức chế (ví dụ, làm giảm) sự gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết với kháng nguyên đối chứng (ví dụ, phôi tử hoặc kháng thể đối chứng) với kháng nguyên chung (ví dụ, kháng nguyên Claudin18.2 hoặc đoạn của nó). Có nhiều loại thử nghiệm gắn kết cạnh tranh để xác định liệu protein gắn kết với kháng nguyên có cạnh tranh với

protein khác hay không. Các thử nghiệm này là, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ trực tiếp hoặc gián tiếp ở pha rắn (radioimmunoassay-RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym trực tiếp hoặc gián tiếp ở pha rắn (enzyme immunoassay-EIA), thử nghiệm cạnh tranh Sandwich (ví dụ, xem tài liệu, Stahli et al, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253); EIA biotin-avidin trực tiếp ở pha rắn (xem tài liệu, ví dụ, Kirkland et al, 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619), thử nghiệm đánh dấu trực tiếp ở pha rắn, thử nghiệm bánh kẹp đánh dấu trực tiếp ở pha rắn (xem tài liệu, ví dụ, Harlow và Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA đánh dấu trực tiếp ở pha rắn với nguyên tử đánh dấu I-125 (xem tài liệu, ví dụ, Morel et al, 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); EIA biotin-avidin trực tiếp ở pha rắn (ví dụ, xem tài liệu, Cheung, et al, 1990, *Virology* 176: 546-552); và RIA đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer et al, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). Thông thường, thử nghiệm này có liên quan đến việc sử dụng kháng nguyên đã tinh chế có khả năng gắn kết với bề mặt chất rắn hoặc tế bào mà được nạp protein gắn kết với kháng nguyên thử nghiệm không được đánh dấu và protein gắn kết với kháng nguyên đối chứng được đánh dấu. Ước chế cạnh tranh được xác định bằng cách đo lượng chất đánh dấu gắn kết với bề mặt rắn hoặc với tế bào khi có mặt protein gắn kết với protein thử nghiệm. Thông thường, protein gắn kết với kháng nguyên thử nghiệm có mặt với lượng dư. Protein gắn kết với kháng nguyên được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh (cạnh tranh với protein gắn kết với kháng nguyên) bao gồm: các protein gắn kết với kháng nguyên mà gắn kết với epitop giống như protein gắn kết với kháng nguyên đối chứng; và các protein gắn kết với kháng nguyên mà gắn kết với epitop mà đủ gần với epitop mà protein gắn kết với kháng nguyên đối chứng gắn vào, trong đó hai epitop tương tác với nhau trong không gian để cản trở việc gắn kết. Các mô tả chi tiết hơn về các phương pháp xác định sự gắn kết cạnh tranh được đề cập trong các ví dụ ở đây. Thông thường, khi một protein gắn kết với kháng nguyên cạnh tranh có mặt với lượng dư, nó sẽ ức chế (ví dụ, làm giảm) ít nhất 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% hoặc 75% hoặc thậm chí lớn hơn sự gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết với kháng nguyên đối chứng với kháng nguyên chung. Trong một vài trường hợp, sự gắn kết này được ức chế ít nhất 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, hoặc 97% hoặc thậm chí là lớn hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân tử axit nucleic" được dùng để chỉ các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là mạch đơn hoặc mạch kép, và tốt hơn là ADN mạch kép hoặc mARN mạch đơn hoặc mARN đã cải biến. Axit nucleic "được liên kết động" khi nó được đặt vào trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, trình tự khởi đầu hay trình tự tăng cường được liên kết động với trình tự mã hóa nếu nó tác động đến quá trình phiên mã của trình tự mã hóa.

“Tính tương đồng” của trình tự axit amin được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin mà giống nhau giữa trình tự thứ nhất và trình tự thứ hai khi các trình tự axit amin này được sắp thẳng hàng (đưa các khoảng trống vào nếu cần) để đạt được tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự tối đa, và thay thế bảo toàn bất kỳ không được coi là một phần của tính tương đồng trình tự. Để xác định tỷ lệ phần trăm tính tương đồng trình tự axit amin, có thể tiến hành sắp thẳng hàng theo nhiều cách trong phạm vi kỹ thuật đã biết, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính sẵn có công khai, như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để đánh giá sự sắp thẳng hàng, kể cả thuật toán bất kỳ để đạt được sự sắp thẳng hàng tối đa so với toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh.

Thuật ngữ "vector biểu hiện” được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà liên kết với nó. Theo một phương án, vector là "plasmid," mà được dùng để chỉ vòng ADN tròn mạch kép mà các đoạn ADN khác có thể được nối vào. Theo một phương án khác, vector này là vector virus, trong đó các đoạn ADN khác có thể được nối vào bộ gen virus. Các vector được bộc lộ ở đây có khả năng tự tái bản trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, các vector vi khuẩn có nguồn tái bản từ vi khuẩn và các vector động vật có vú dạng episom), hoặc có thể được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ sau khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được tái bản cùng với bộ gen của tế bào chủ (ví dụ, các vector động vật có vú không phải dạng episom).

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, Antibodies: a

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 và 15. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch bằng Claudin18.2 của người hoặc đoạn của nó, và các kháng thể thu được sau đó có thể được phục hồi đặc tính, tinh chế và giải trình tự đối với các trình tự axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đoạn gắn kết với kháng nguyên cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp thông thường. Các kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế được thao tác di truyền để kết hợp một hoặc nhiều vùng khung của người vào các vùng CDR thu được từ kháng thể không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể thu được từ ImMunoGeneTics (IMGT) thông qua trang web <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ The Immunoglobulin Facts Book, 2001, ISBN 012441351, bằng cách sắp xếp thẳng hàng so với cơ sở dữ liệu gen dòng mầm biến đổi của kháng thể người IMGT bằng cách sử dụng phần mềm MOE.

Thuật ngữ "tế bào chủ" được dùng để chỉ tế bào mà vector biểu hiện được đưa vào. Các tế bào chủ có thể bao gồm tế bào vi khuẩn, vi trùng, thực vật hoặc động vật. Vi khuẩn nhạy cảm được biến nạp bao gồm các thành viên thuộc chi *enterobacteriaceae* như các chủng *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; *Bacillaceae* như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Các vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Các dòng tế bào chủ động vật thích hợp bao gồm CHO (dòng tế bào chuột hàng Trung Quốc), tế bào 293 và tế bào NS0.

Các kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế có thể được sản xuất và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tách dòng và tái tổ hợp trong vector biểu hiện. Vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào chủ. Giống như giải pháp kỹ thuật đã biết được đề xuất nhiều hơn, các hệ biểu hiện của động vật có vú có thể dẫn đến glycosyl hóa kháng thể, đặc biệt là ở các vị trí đầu N được bảo toàn cao của vùng Fc. Các dòng ổn định được tạo ra bằng cách biểu hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu với Claudin 18.2 của người. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong các bình phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy, mà kháng thể được tiết

vào đó, có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, có thể tiến hành tinh chế trên cột Protein A hoặc G Sepharose FF mà đã được điều chỉnh bằng dung dịch đệm. Các thành phần gắn kết không đặc hiệu được rửa trôi. Kháng thể đã gắn kết được giải hấp bằng gradien pH và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE, và sau đó được thu gom. Các kháng thể có thể được lọc và cô bằng các kỹ thuật thông thường. Các hỗn hợp và multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, như loại trừ theo kích thước hoặc trao đổi ion. Sản phẩm thu được sau đó được đông lạnh ngay lập tức, ví dụ ở nhiệt độ -70°C , hoặc có thể được đông khô.

Thuật ngữ "sử dụng", "dùng liều" hoặc "điều trị," nếu được áp dụng cho động vật, người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, được dùng để chỉ việc cho dược chất, chất điều trị, chất chẩn đoán ngoại sinh, hoặc chế phẩm tiếp xúc với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. Thuật ngữ "sử dụng", "dùng liều" hoặc "điều trị" có thể được dùng để chỉ các phương pháp điều trị, dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thử nghiệm chẳng hạn. Việc điều trị tế bào bao gồm cho chất phản ứng tiếp xúc với tế bào, cũng như là cho chất phản ứng tiếp xúc với dịch, dịch này được cho tiếp xúc với tế bào. Thuật ngữ "sử dụng", "dùng liều" hoặc "điều trị" cũng có nghĩa là điều trị *in vitro* hoặc *ex vivo*, ví dụ tế bào bằng chất phản ứng, chất chẩn đoán hoặc chất gắn kết, hoặc bằng tế bào khác. "Điều trị", nếu được áp dụng cho người, thú y hoặc đối tượng nghiên cứu, được dùng để chỉ việc điều trị chữa bệnh, các biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

Thuật ngữ "điều trị" có nghĩa là sử dụng chất điều trị, như chế phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể hoặc các đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế, ở bên trong hoặc bên ngoài bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà chất điều trị có hoạt tính điều trị đã biết. Thông thường, chất này được sử dụng với lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở bệnh nhân hoặc nhóm bệnh nhân cần điều trị, để làm thoái lui hoặc ức chế sự tiến triển của (các) triệu chứng này đến mức có thể đánh giá được trên lâm sàng. Lượng chất điều trị mà hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ (cũng được dùng để chỉ là "lượng hữu hiệu để điều trị") có thể khác nhau tùy thuộc vào

các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, và thể trọng của bệnh nhân, và khả năng được chất gây ra đáp ứng mong muốn ở bệnh nhân. Liệu triệu chứng bệnh đã được làm thuyên giảm hay không có thể được đánh giá bằng biện pháp lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi bác sỹ hoặc các nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe chuyên nghiệp khác để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Trong khi phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc sản phẩm sản xuất) có thể không có hiệu quả trong việc làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh đích ở mọi bệnh nhân, thì nó lại làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh đích ở một số lượng bệnh nhân có ý nghĩa thống kê như được xác định bằng kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như kiểm định t Student, kiểm định chi bình phương, kiểm định U theo Mann và Whitney, kiểm định Kruskal-Wallis (kiểm định H), kiểm định Jonckheere-Terpstra và kiểm định Wilcoxon.

"Cải biến bảo toàn" hoặc "thay thế bảo toàn" được dùng để chỉ các thay thế axit amin ở protein bằng các axit amin khác có các đặc tính tương tự (ví dụ, điện tích, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/ưa nước, cấu hình khung và độ cứng, v.v.), như các thay đổi có thể xảy ra thường xuyên mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, nói chung, một axit amin thay thế đơn ở vùng không cần thiết của polypeptit hầu như không làm thay đổi hoạt tính sinh học (ví dụ xem tài liệu, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Page 224, 4th edition). Ngoài ra, các thay thế với axit amin tương tự về mặt cấu trúc hoặc chức năng có thể ít làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học. Các thay thế bảo toàn được lấy làm ví dụ được nêu trong bảng dưới đây, "các thay thế axit amin bảo toàn được lấy làm ví dụ".

Bảng 3. Các thay thế axit amin bảo toàn được lấy làm ví dụ

Gốc ban đầu	Gốc thay thế bảo toàn
Ala (A)	Gly; Ser
Arg(R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val

Gln(Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

"Lượng hữu hiệu" hoặc "liều hữu hiệu" được dùng để chỉ lượng thuốc, hợp chất hoặc được phẩm cần để thu được một hoặc nhiều kết quả có lợi hoặc mong muốn. Đối với các ứng dụng phòng ngừa, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm làm thuyên giảm hoặc làm giảm nguy cơ, làm giảm mức độ nặng, hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh, bao gồm các biểu hiện sinh hóa, mô học và hành vi của tình trạng bệnh, các biến chứng của nó, và các kiểu hình bệnh học trung gian trong quá trình tiến triển tình trạng bệnh. Đối với các ứng dụng điều trị, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm các kết quả lâm sàng, như làm giảm tỷ lệ mắc các tình trạng bệnh khác nhau có liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của tình trạng bệnh, làm giảm liều dùng của các chất khác cần để điều trị tình trạng bệnh, tăng cường hiệu quả của chất khác, và/hoặc làm chậm sự tiến triển của tình trạng bệnh có liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế ở bệnh nhân.

"Ngoại sinh" được dùng để chỉ các chất được tổng hợp bên ngoài sinh vật, tế bào hoặc người tùy theo các tình huống.

"Nội sinh" được dùng để chỉ các chất được tổng hợp trong tế bào, sinh vật, hoặc cơ thể người tùy theo các tình huống.

"Tính tương đồng" được dùng để chỉ tính tương đồng trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Nếu một vị trí ở cả hai trình tự cần so sánh được chiếm giữ bởi cùng một tiểu đơn vị monome axit amin hoặc bazơ,

ví dụ nếu một vị trí trong mỗi phân tử trong số hai phân tử ADN bị chiếm giữ bởi adenin, thì các phân tử này là tương đồng ở vị trí đó. Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự là một hàm số các vị trí bắt cặp hoặc tương đồng có chung bởi hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh và nhân với 100. Ví dụ, khi hai trình tự được sắp thẳng hàng tối ưu, nếu 6 trong số 10 vị trí trong hai trình tự này được bắt cặp hoặc tương đồng, thì hai trình tự được coi là tương đồng 60%; nếu 95 trong số 100 vị trí trong hai trình tự được bắt cặp hoặc tương đồng, thì hai trình tự này được coi là tương đồng 95%. Nói chung, nếu hai trình tự được sắp thẳng hàng, việc so sánh được tiến hành để đạt được tỷ lệ tương đồng tối đa. Ví dụ, sự so sánh có thể được tiến hành bằng thuật toán BLAST, trong đó các thông số của thuật toán được chọn để đạt được sự bắt cặp tối đa giữa mỗi trình tự trên toàn bộ chiều dài của mỗi trình tự đối chứng. Các tài liệu đối chứng dưới đây đề cập đến thuật toán BLAST thường được sử dụng để phân tích trình tự: thuật toán BLAST (BLAST ALGORITHMS): Altschul, SF et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. et al., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, TL et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, SF et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. et al. (1997) Genome Res. 7:649-656. Các thuật toán BLAST thông thường khác như các thuật toán sẵn có từ NCBI BLAST cũng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào," "dòng tế bào," và "chủng nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay đổi cho nhau và tất cả các thuật ngữ này bao gồm cả thể hệ con. Do đó, "tế bào biến nạp" và "tế bào đã biến nạp" bao gồm các tế bào và các chủng nuôi cấy sơ cấp thu được từ đó bất kể số lần cấy chuyển. Cần hiểu rằng tất cả thể hệ con có thể không giống nhau hoàn toàn về lượng ADN, do các đột biến cố ý hoặc không cố ý. Thể hệ con đột biến mà có cùng hoạt tính sinh học hoặc chức năng như được sàng lọc trong các tế bào đã biến nạp ban đầu được bao gồm. Nếu có các chỉ định khác được dự định, thì sẽ được hiểu rõ ràng theo ngữ cảnh.

Thuật ngữ "phân lập" được dùng để chỉ một phân tử hầu như không có các phân tử sinh học khác, như axit nucleic, protein, lipid, cacbohydrat, hoặc các nguyên liệu khác, như mảnh vỡ tế bào và môi trường nuôi cấy. Nói chung, thuật ngữ "phân lập" không được dự định có nghĩa là không có mặt hoàn toàn các nguyên liệu này

hoặc không có mặt nước, dung dịch đậm, hoặc muối, trừ phi chúng có mặt với lượng mà hầu như không làm ảnh hưởng đến việc sử dụng hợp chất để thử nghiệm hoặc điều trị như được mô tả ở đây.

"Tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc trường hợp đi sau thật ngữ này có thể nhưng không nhất thiết phải xảy ra, và thuật ngữ này bao gồm các ví dụ trong đó sự kiện hoặc trường hợp xảy ra hoặc không xảy ra.

"Dược phẩm" được dùng để chỉ hỗn hợp của một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế hoặc muối hoặc tiền dược chất được dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý của chúng và các thành phần hóa học khác, như chất mang và tá dược được dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý. Dược phẩm nhằm thúc đẩy việc sử dụng cho sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu dược chất và nhờ đó tạo ra tác dụng sinh học.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dùng để chỉ chất không có hoạt tính thích hợp để sử dụng trong dược phẩm để phân phối kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên. Chất mang có thể là chất chống kết dính, chất kết dính, chất bao, chất gây rã, chất độn hoặc chất pha loãng, chất bảo quản (như chất chống oxy hóa, chất kháng khuẩn hoặc chất kháng nấm), chất tạo ngọt, chất làm chậm hấp thu, chất làm ẩm, chất nhũ hóa, chất đệm và chất tương tự. Các ví dụ về các chất mang dược dụng thích hợp bao gồm nước, etanol, polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và chất tương tự) dextroza, dầu thực vật (như dầu oliu), dung dịch nước muối, dung dịch đậm, dung dịch nước muối được đệm, và chất đẳng trương, như đường, polyol, sorbitol và natri clorua.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chất điều trị bệnh có liên quan đến các tế bào dương tính với kháng nguyên đích (như Claudin18.2), chất bao gồm kháng thể kháng Claudin18.2 hoặc đoạn gắn kết với kháng thể của nó theo sáng chế làm hoạt chất.

Không có giới hạn cụ thể về bệnh có liên quan đến Claudin 18.2 theo sáng chế, miễn là bệnh này có liên quan đến Claudin 18.2. Ví dụ, đáp ứng điều trị được gây ra bởi phân tử theo sáng chế bao gồm: (1) ngăn ngừa Claudin 18.2 gắn kết với thụ thể/phối tử của nó, thông qua việc gắn kết phân tử theo sáng chế với Claudin 18.2 của người, hoặc (2) giết các tế bào khối u biểu hiện quá mức Claudin 18.2. Do

đó, các phân tử theo sáng chế, nếu được bao gồm trong các chế phẩm và các công thức thích hợp cho ứng dụng điều trị, là rất hữu dụng cho những người mà mang khối u hoặc bị bệnh ung thư, tốt hơn là u melanin, ung thư đại tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột, ung thư thận, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư bàng quang, v.v..

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2), các chất phản ứng để phát hiện miễn dịch hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2), các phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định tế bào biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2), và các chất chẩn đoán để chẩn đoán bệnh có liên quan đến tế bào dương tính với kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2), bao gồm kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế mà nhận diện đặc hiệu kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2 của người) và gắn kết với các trình tự axit amin ngoại bào hoặc với cấu trúc bậc ba của chúng làm thành phần có hoạt tính.

Theo sáng chế, phương pháp phát hiện hoặc đo lường kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2) có thể là phương pháp đã biết bất kỳ. Ví dụ, phương pháp này bao gồm thử nghiệm miễn dịch hoặc phương pháp phát hiện miễn dịch.

Thử nghiệm miễn dịch hoặc phương pháp phát hiện miễn dịch là phương pháp phát hiện hoặc đo lường kháng thể hoặc kháng nguyên với kháng thể hoặc kháng nguyên đã được đánh dấu. Các ví dụ về các phương pháp thử nghiệm miễn dịch hoặc phát hiện miễn dịch bao gồm phương pháp kháng thể miễn dịch được đánh dấu chất phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA hoặc ELISA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang, thấm tách tây, phương pháp hóa lý, và phương pháp tương tự.

Các bệnh nêu trên có liên quan đến tế bào dương tính Claudin18.2 có thể được chẩn đoán bằng cách phát hiện hoặc đo lường tế bào biểu hiện Claudin18.2 bằng cách sử dụng kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế.

Các tế bào biểu hiện polypeptit có thể được phát hiện bằng các phương pháp phát hiện miễn dịch đã biết, tốt hơn là bằng cách kết tủa miễn dịch, nhuộm tế bào huỳnh quang, nhuộm mô miễn dịch và phương pháp tương tự. Ngoài ra, phương pháp như phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang với hệ thống

FMAT8100HTS (Applied Biosystem) có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, không có giới hạn cụ thể về các mẫu cần phát hiện hoặc đo kháng nguyên đích (ví dụ, Claudin18.2), miễn là chúng có thể bao gồm các tế bào biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ Claudin18.2), như mô, tế bào, máu, huyết tương, huyết thanh, dịch tụy, nước tiểu, phân, dịch mô hoặc môi trường nuôi cấy.

Tùy thuộc vào phương pháp chẩn đoán được yêu cầu, chất chẩn đoán bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể của nó theo sáng chế cũng có thể bao gồm các chất để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể hoặc các chất để phát hiện phản ứng. Các chất phản ứng để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể bao gồm dung dịch đệm, muối và chất phản ứng khác. Các chất phản ứng để phát hiện bao gồm các chất phản ứng thường được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch hoặc các phương pháp phát hiện miễn dịch, ví dụ, kháng thể thứ cấp được đánh dấu mà nhận diện kháng thể đơn dòng, đoạn kháng thể hoặc thể tiếp hợp của chúng, và chất tương ứng với chất đánh dấu.

Mô tả chi tiết về một hoặc nhiều phương án theo sáng chế được nêu trong phần mô tả trên đây. Các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây, mặc dù phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc giống với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế. Nhờ bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, các dấu hiệu, mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn. Trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, các thuật ngữ số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi được chỉ ra rõ ràng theo cách khác. Trừ khi được chỉ ra rõ ràng theo cách khác ở đây, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tất cả các patent, công bố được viện dẫn trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ dưới đây được trình bày để minh họa đầy đủ hơn các phương án được ưu tiên của sáng chế. Các ví dụ này không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ, và phạm vi của sáng chế được xác định bởi yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra dòng tế bào biểu hiện nhiều Claudin 18.2

Chất chuyển nhiễm lipofectamin 3000 được sử dụng để chuyển nhiễm plasmit vector biểu hiện lentivirus pCDH-hClaudin18.2 và vector đóng gói hệ lentivirus pVSV-G, pCMV-dR8.91 vào tế bào đóng gói virus 293T; dịch nổi của môi trường nuôi cấy chứa virus được thu gom, lọc và ly tâm ở tốc độ siêu cao; virus cô đặc được sử dụng để gây nhiễm dòng tế bào caxinom tế bào vòng ở dạ dày của người NUGC4, được sàng lọc với puromycin trong hai đến ba tuần, và sau đó được phân loại bằng cách phân loại tế bào đơn FACS.

Mức biểu hiện của Claudin 18.2 được xác định theo điểm số IHC khối u. Các tế bào có mức biểu hiện Claudin 18.2 tương đương với các khối u có điểm số IHC bằng 3 được coi là các tế bào biểu hiện cao, và các tế bào với mức biểu hiện Claudin 18.2 tương đương với mức biểu hiện của khối u với điểm số IHC bằng 2 được coi là tế bào biểu hiện trung bình. Mức biểu hiện Claudin18.2 trên bề mặt các tế bào NUGC4 được gây nhiễm lentivirus được phát hiện bằng cách phát hiện FACS, và các dòng tế bào đơn dòng NUGC4/hClaudin18.2 có mức biểu hiện Claudin18.2 cao nhất được chọn. Đồng thời, mức biểu hiện Claudin 18.2 trên bề mặt các tế bào NUGC4 kiểu đại được phát hiện bằng FACS, và các dòng tế bào NUGC4 có mức biểu hiện Claudin 18.2 trung bình được chọn. NUGC4 kiểu đại là các tế bào có mức biểu hiện Claudin 18.2 thấp.

Các dòng tế bào đơn dòng được chọn được nhân rộng và nuôi cấy, và đông lạnh và bảo quản cho các thử nghiệm tiếp theo.

Trình tự Claudin 18.2 ngân hàng gen: NP_001002026: (SEQ ID NO: 1)

MAVTACQGLGFVVSLLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLNNPVTAVFNY
QGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSI
FALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWM
STANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACR
GLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGART
EDEVQSYPSKHDYV.

Trình tự ADN của Claudin 18.2: (SEQ ID NO:2)

1 AGAATTGCGC TGTCCACTTG TCGTGTGGCT CTGTGTCGAC ACTGTGCGCC ACCATGGCCG
61 TGA CTGCTTG TCAGGGCTTG GGGTTCGTGG TTTCATGAT TGGGATTGCG GGCATCAT TG
121 CTGCCACCTG CATGGACCAG TGGAGCACCC AAGACTTGTA CAACAACCCC GTAACAGCTG

```

181 TTTTCAACTA CCAGGGGCTG TGGCGCTCCT GTGTCCGAGA GAGCTCTGGC TTCACCGAGT
241 GCCGGGGCTA CTTACCCCTG CTGGGGGCTGC CAGCCATGCT GCAGGCAGTG CGAGCCCTGA
301 TGATCGTAGG CATCGTCCTG GGTGCCATTG GCCTCCTGGT ATCCATCTTT GCCCTGAAAT
361 GCATCCGCAT TGGCAGCATG GAGGACTCTG CCAAAGCCAA CATGACACTG ACCTCCGGGA
421 TCATGTTCAT TGTCTCAGGT CTTTGTGCAA TTGCTGGAGT GTCTGTGTTT GCCAACATGC
481 TGGTGAATAA CTTCTGGATG TCCACAGCTA ACATGTACAC CGGCATGGGT GGGATGGTGC
541 AGACTGTTCA GACCAGGTAC ACATTTGGTG CGGCTCTGTT CGTGGGCTGG GTCGCTGGAG
601 GCCTCACACT AATTGGGGGT GTGATGATGT GCATCGCCTG CCGGGGCTG GCACCAGAAG
661 AAACCAACTA CAAAGCCGTT TCTTATCATG CCTCAGGCCA CAGTGTGTC TACAAGCCTG
721 GAGGCTTCAA GGCCAGCACT GGCTTTGGGT CCAACACCAA AAACAAGAAG ATATACGATG
781 GAGGTGCCCC CACAGAGGAC GAGGTACAAT CTTATCCTTC CAAGCACGAC TATGTGTAAT
841 GCTCTAAGAC CTCTCAGCAC GGGCGGAAGA AACTCCCGGA GAGCTCACCC AAAAAACAAG
901 GAGATCCCAT CTAGATTTCT TCTTGCTTTT GACTCACAGC TGGAAGTTAG AAAAGCCTCG
961 ATTTTCATCTT TGGAGAGGCC AAATGGTCTT AGCCTCAGTC TCTGTCTCTA AATATTCCAC
1021 CATAAAACAG CTGAGTTATT TATGAATTAG AGGCTATAGC TCACATTTTC AATCCTCTAT
1081 TTCTTTTTTTT AAATATAACT TTCTACTCTG ATGAGAGAAT GTGGTTTTAA TCTCTCTCTC
1141 ACATTTTGAT GATTTAGACA GACTCCCCCT CTTCTCCTTA GTCAATAAAC CCATTGATGA
1201 TCTATTTCCC AGCTTATCCC CAAGAAAAC TTTGAAAGGA AAGAGTAGAC CCAAAGATGT
1261 TATTTTCTGC TGTTTGAATT TTGTCTCCCC ACCCCCAACT TGGCTAGTAA TAAACACTTA
1321 CTGAAGAAGA AGCAATAAGA GAAAGATATT TGTAATCTCT CCAGCCCATG ATCTCGGTTT
1381 TCTTACACTG TGATCTTAAA AGTTACCAA CCAAAGTCAT TTTTCAGTTT AGGCAACCAA
1441 ACCTTTCTAC TGCTGTTGAC ATCTTCTTAT TACAGCAACA CCATTCTAGG AGTTTCTCTGA
1501 GCTCTCCACT GGAGTCCTCT TTCTGTCGCG GGTGAGAAAT TGTCCCTAGA TGAATGAGAA
1561 AATTATTTTTT TTTAATTTAA GTCCTAAATA TAGTTAAAAT AAATAATGTT TTAGTAAAAT
1621 GATACACTAT CTCTGTGAAA TAGCCTCACC CCTACATGTG GATAGAAGGA AATGAAAAAA
1681 TAATTGCTTT GACATTGTCT ATATGGTACT TTGTAAAGTC ATGCTTAAGT ACAAATTCCA
1741 TGAAAAGCTC ACTGATCCTA ATTCTTTCCC TTTGAGGTCT CTATGGCTCT GATTGTACAT
1801 GATAGTAAGT GTAAGCCATG TAAAAAGTAA ATAATGTCTG GGCACAGTGG CTCACGCCTG
1861 TAATCCTAGC ACTTTGGGAG GCTGAGGAGG AAGGATCACT TGAGCCGAGA AGTTTCGAGAC
1921 TAGCCTGGGC AACATGGAGA AGCCCTGTCT CTACAAAATA CAGAGAGAAA AAATCAGCCA
1981 GTCATGGTGG CCTACACCTG TAGTCCCAGC ATTCCGGGAG GCTGAGGTGG GAGGATCACT
2041 TGAGCCGAGG GAGGTTGGGG CTGCAGTGAG CCATGATCAC ACCACTGCAC TCCAGCCAGG
2101 TGACATAGCG AGATCCTGTC TAAAAAATA AAAAAATAAT AATGGAACAC AGCAAGTCCT
2161 AGGAAGTAGG TTAATACTAA TTCTTTAAAA AAAAAAATAA GTTGAGCCTG AATTAAATGT
2221 AATGTTTCCA AGTGACAGGT ATCCACATTT GCATGGTTAC AAGCCACTGC CAGTTAGCAG
2281 TAGCACTTTC CTGGCACTGT GGTGCGTTTT GTTTTGTGTT GCTTTGTGTTA GAGACGGGGT
2341 CTCACCTTCC AGGCTGGCCT CAACTCCTG CACTCAAGCA ATTCTTCTAC CCTGGCCTCC
2401 CAAGTAGCTG GAATTACAGG TGTGCGCCAT CACAACAGC TGGTGGTCAG TTTTGTACT
2461 CTGAGAGCTG TTCACCTCTC TGAATTCACC TAGAGTGGTT GGACCATCAG ATGTTTGGGC
2521 AAAACTGAAA GCTCTTTGCA ACCACACACC TTCCCTGAGC TTACATCACT GCCCTTTTGA
2581 GCAGAAAGTC TAAATTCCTT CCAAGACAGT AGAATTCCAT CCCAGTACCA AAGCCAGATA
2641 GGCCCCCTAG GAAACTGAGG TAAGAGCAGT CTCTAAAAAC TACCCACAGC AGCATTGGTG
2701 CAGGGGAACT TGGCCATTAG GTTATTATTT GAGAGGAAAG TCCTCACATC AATAGTACAT
2761 ATGAAAGTGA CCTCCAAGGG GATTGGTGAA TACTCATAAG GATCTTCAGG CTGAACAGAC
2821 TATGTCTGGG GAAAGAACGG ATTATGCCCC ATTAAATAAC AAGTTGTGTT CAAGAGTCAG
2881 AGCAGTGAGC TCAGAGGCCC TTCTCACTGA GACAGCAACA TTAAACCAA ACCAGAGGAA
2941 GTATTTGTGG AACTCACTGC CTCAGTTTGG GTAAAGGATG AGCAGACAAG TCAACTAAAG
3001 AAAAAAGAAA AGCAAGGAGG AGGGTTGAGC AATCTAGAGC ATGGAGTTTG TTAAGTGCTC
3061 TCTGGATTTG AGTTGAAGAG CATCCATTTG AGTTGAAGGC CACAGGGCAC AATGAGCTCT
3121 CCCTTCTACC ACCAGAAAGT CCCTGGTCAG GTCTCAGGTA GTGCGGTGTG GCTCAGCTGG
3181 GTTTTTAATT AGCGCATTTCT CTATCCAACA TTTAATTGTT TGAAAGCCTC CATATAGTTA
3241 GATTGTGCTT TGTAATTTTG TTGTTGTTGC TCTATCTTAT TGTATATGCA TTGAGTATTA
3301 ACCTGAATGT TTTGTTACTT AAATATTAAA AACACTGTTA TCCTACAGTT.

```

Ví dụ 2: Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng claudin18.2 của người

1. Gây miễn dịch

Các kháng thể đơn dòng kháng Claudin 18.2 của người được sản xuất bằng cách gây miễn dịch chuột.

Chuột trắng SJL, cái, 6-8 tuần tuổi được sử dụng cho thử nghiệm (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., số xin phép sản xuất động vật: SCXK (Beijing) 2012-0001). Môi trường nuôi dưỡng: cấp độ SPF. Sau khi được mua về, chuột được giữ trong môi trường thử nghiệm trong 1 tuần, chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ 20-25°C; độ ẩm 40-60%. Sau đó, chuột mà đã được làm thích nghi với môi trường được gây miễn dịch theo các quy trình sau. Kháng nguyên miễn dịch là tế bào huClaudin18.2-HEK293 (dòng tế bào HEK-293 được chuyển nhiễm ổn định plasmit Claudin 18.2 của người).

Quy trình gây miễn dịch: trước khi được gây miễn dịch sơ bộ bằng các tế bào, chuột được tiêm qua đường dưới màng bụng (IP) với tá được TiterMax® Gold (Sigma Cat No. T2684), 0,1ml/chuột; một nửa giờ sau đó, mỗi con chuột được tiêm qua đường dưới màng bụng (IP) với dịch tế bào được pha loãng đến nồng độ bằng 1×10^8 /ml bằng 0,1ml dung dịch nước muối. Sau khi các tế bào được phân tán đều bằng cách hút pipet, chúng được cấy vào ngày 0, ngày 14, ngày 28, ngày 42 và ngày 56. Các mẫu máu được thu gom vào ngày 21, 35, 49 và 63; hiệu giá kháng thể trong huyết thanh chuột được xác định bằng phương pháp ELISA. Sau 4 đến 5 lần gây miễn dịch, chuột có hiệu giá kháng thể trong huyết thanh cao có xu hướng ổn định được chọn để dung hợp với tế bào lách. Ba ngày trước khi dung hợp với tế bào lách, 1×10^7 tế bào được tiêm qua đường trong màng bụng (IP) để gây miễn dịch nhắc lại.

2. Dung hợp với tế bào lách

Các tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào lympho được sản sinh bởi lá lách với các tế bào u tủy Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) bằng cách sử dụng quy trình dung hợp qua trung gian PEG. Các tế bào lai được tái huyền phù trong môi trường đầy đủ (môi trường IMDM chứa 20% FBS, 1×HAT, 1×OPI) ở mật độ $0,5 \times 10^6$ đến 1×10^6 /ml, được nuôi cấy trong đĩa có 96 lỗ, được ủ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong 3-4 ngày, được bổ sung 100μl/lỗ môi trường đầy đủ HAT, và được nuôi thêm 3-4 ngày nữa cho đến khi tạo thành các dòng. Dịch nổi được loại bỏ, bỏ

sung 200µl/lỗ môi trường đầy đủ HT (môi trường IMDM chứa 20% FBS, 1×HT và 1×OPI), ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 3 ngày và sau đó phát hiện bằng thử nghiệm ELISA.

3. Sàng lọc các tế bào lai

Theo mật độ phát triển của các tế bào lai, dịch nuôi cấy được phát hiện bằng phương pháp ELISA gắn kết. Các tế bào có khả năng gắn kết mạnh với các tế bào huClaudin18.2-HEK293 nhưng không gắn kết với tế bào HEK293 được chọn, và sau đó được nhân rộng và bảo quản lạnh đúng lúc; tách dòng phụ được tiến hành từ hai đến ba lần cho đến khi thu được một dòng tế bào đơn.

Các tế bào sau mỗi lần tách dòng phụ cũng được kiểm tra bằng thử nghiệm gắn kết tế bào. Các dòng tế bào lai được thu bằng cách sàng lọc thông qua thử nghiệm trên đây. Các kháng thể còn được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh. Các kháng thể được tinh chế theo ví dụ về quy trình tinh chế và được sử dụng trong các ví dụ thử nghiệm.

Ví dụ 3: Làm tương thích với người các kháng thể của chuột

Các dòng tế bào lai đơn dòng mAb1901 và mAb1902 với hoạt tính *in vitro* cao được chọn; các trình tự kháng thể đơn dòng được tách dòng và sau đó được làm tương thích với người, được biểu hiện tái tổ hợp và đánh giá hoạt tính.

Các quy trình tách dòng các trình tự từ tế bào lai là như sau. Các tế bào lai ở pha phát triển logarit được thu gom. Các ARN được chiết bằng Trizol (Invitrogen, 15596-018) theo hướng dẫn sử dụng kit và được phiên mã ngược nhờ enzym phiên mã ngược PrimeScript™ (Takara, cat # 2680A). Các cADN thu được từ quá trình phiên mã ngược được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi-Ig của chuột (Novagen, TB326 Rev. B 0503), và các sản phẩm đã khuếch đại được gửi tới công ty để giải trình tự. Trình tự axit amin tương ứng với các trình tự ADN thu được được thể hiện trong các SEQ ID NO: 3-6;

vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb1901 chuột (SEQ ID NO:3)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLE
WIAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCA
RGGYDTRNAMDYWGQGTSVTVSS.

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb1901 chuột (SEQ ID NO:4)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKP
GQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYHCQNDLY
YPLTFGAGTKLELK.

vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb1902 chuột (SEQ ID NO: 5)

EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGL
EWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCA
RLKTGNSFDYWGQGTTLTVSS.

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb1902 chuột (SEQ ID NO:6)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG
QPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCQNAITY
PFTFGSGTKLEIK.

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của chuột trên đây lần lượt được liên kết với vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 của người và vùng cố định chuỗi nhẹ kappa của người như được mô tả dưới đây, để tạo thành các kháng thể khảm ch1901 và ch1902.

Vùng cố định được chọn từ các trình tự sau:

Vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 của người (SEQ ID NO: 7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Vùng cố định chuỗi nhẹ kappa của người: (SEQ ID NO:8)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC.

Các kháng thể đơn dòng của chuột được làm tương thích với người như được mô tả trong nhiều tài liệu trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói tóm lại, các miền cố định gốc (kháng thể chuột) được thay thế bằng các miền cố định của người, và các

trình tự kháng thể dòng mầm của người được chọn dựa trên tính tương đồng của các kháng thể chuột và người để tiến hành ghép CDR. Theo sáng chế, các phân tử dự tuyển có hoạt tính thích hợp được chọn để làm tương thích với người, và các kết quả thu được là như sau.

1. Các vùng CDR của kháng thể chuột

Các gốc axit amin của CDR VH/VL trong bảng 4 được xác định và được chú thích theo tiêu chí đánh số Kabat.

Các trình tự CDR của các kháng thể chuột được thể hiện trong bảng 4:

Bảng 4. Các trình tự CDR của các kháng thể chuột

Kháng thể	mAb1901
HCDR1	DYGIH (SEQ ID NO: 9)
HCDR2	YISRGSSSTIYYADTVKG (SEQ ID NO: 10)
HCDR3	GGYDTRNAMDY (SEQ ID NO: 11)
LCDR1	KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 12)
LCDR2	GASTRAS (SEQ ID NO: 13)
LCDR3	QNDLYYPLT (SEQ ID NO: 14)
Kháng thể	mAb1902
HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 15)
HCDR2	MIHPNSGSTNYNEKFKGR (SEQ ID NO: 16)
HCDR3	LKTGNSFDY (SEQ ID NO: 17)
LCDR1	KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 18)
LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 19)
LCDR3	QNAYTYPFT (SEQ ID NO: 20)

2. Chọn lọc các trình tự vùng FR dòng mầm của người

Trên cơ sở cấu trúc điển hình thu được của kháng thể chuột VH/VLCDR, các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được so sánh với cơ sở dữ liệu dòng mầm để thu được khuôn mẫu dòng mầm của người có tính tương đồng cao. Vùng khung của chuỗi nhẹ dòng mầm của người có nguồn gốc từ gen chuỗi nhẹ kappa của người.

2.1 Làm tương thích với người và thiết kế đột biến ngược ở mAb1901

Dòng mầm của kháng thể người thích hợp được chọn để làm tương thích với người kháng thể chuột mAb1901. Các vùng CDR của kháng thể chuột mAb1901 được ghép với khuôn mẫu làm tương thích với người đã chọn để tạo ra các vùng biến đổi được làm tương thích với người. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng được

làm tương thích với người như được thể hiện trong SEQ ID NO: 24 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 được kết hợp với các vùng cố định IgG để tạo thành kháng nguyên nguyên vẹn. Đồng thời, vùng FR trong vùng V của kháng thể được làm tương thích với người được gây đột biến ngược, và các đột biến ngược được lấy làm ví dụ là như sau:

Bảng 5. Kháng thể mAb1901 được làm tương thích với người và các đột biến ngược*

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người mAb1901		Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1901	
VL1	Không có	VH1	Không có
VL2	N22S	VH2	N82T
VL3	N22S, V85I, Y87H	VH3	V48I, N82T
		VH4	I69M, N82T

*Toàn bộ các vị trí axit amin trong bảng được đánh số theo tiêu chí đánh số Kabat. Trong trường hợp N82T của vùng biến đổi chuỗi nặng, 82 được dùng để chỉ vị trí 82A theo tiêu chí Kabat.

Bảng 6. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1901

Tên vùng biến đổi (SEQ ID NO:)	Trình tự
VL1 (SEQ ID NO: 21)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGGTKLEIK
VL2 (SEQ ID NO: 22)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGGTKLEIK
VL3 (SEQ ID NO: 23)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAIYHCQNDLYYPLTFGQGGTKLEIK
VH1 (SEQ ID NO: 24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH2 (SEQ ID NO: 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH3 (SEQ ID NO: 26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS

26)	TSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TVTVSS
VH4 (SEQ ID NO:27)	EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAP GKGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNSLYLQ MTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TVTVSS

Vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được chỉ ra trong bảng trên đây có thể được liên kết với vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 người như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với vùng cố định chuỗi nhẹ κ của người như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Theo các phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ cũng có thể được liên kết riêng với vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ khác để tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ.

2.2 Làm tương thích với người và thiết kế đột biến ngược ở mAb1902

Dòng mầm kháng thể người thích hợp được chọn để làm tương thích với người kháng thể chuột mAb1902. Các vùng CDR của kháng thể chuột mAb1902 được ghép với khuôn mẫu được làm tương thích với người đã chọn để thu được các vùng biến đổi được làm tương thích với người. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 31 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO:28; và sau đó được tái tổ hợp với các vùng cố định IgG để tạo thành kháng thể nguyên vẹn. Đồng thời, vùng FR trong vùng V của kháng thể được làm tương thích với người được gây đột biến ngược, và các phương pháp gây đột biến ngược được lấy làm ví dụ và các dạng kết hợp là như sau:

Bảng 7. Kháng thể mAb1902 được làm tương thích với người và thiết kế đột biến ngược của nó *

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người mAb1902	Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1902
VL11 Không có	VH11 Không có
VL12 M4L	VH12 I69L, R71L, T73K
VL13 M4L,	VH13 M48I, R66K, V67A, I69L, R71L, T73K

	N22S		
		VH14	R38K, A40R, M48I, R66K, V67A, I69L, R71L, T73K

*Toàn bộ các vị trí axit amin trong bảng được đánh số theo tiêu chí đánh số Kabat.

Bảng 8. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1902

Tên vùng biến đổi (SEQ ID NO:)	Trình tự
VL11 (SEQ ID NO: 28)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ NAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL12 (SEQ ID NO: 29)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ NAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL13 (SEQ ID NO:30)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ NAYTYPFTFGQGTKLEIK
VH11 (SEQ ID NO:31)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQR LEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED AVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS
VH12 (SEQ ID NO: 32)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQR LEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTLTLDKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS
VH13 (SEQ ID NO:33)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQR LEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS
VH14 (SEQ ID NO: 34)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQR LEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS

Vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được chỉ ra trong bảng trên có thể được liên kết với vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 người như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết với vùng cố định chuỗi nhẹ của người như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Trình tự kháng thể có chiều dài đầy đủ được lấy làm ví dụ là như sau:

kháng thể khảm ch1901:

chuỗi nặng ch1901: (SEQ ID NO:35)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYI
SRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARGGY
DTRNAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

chuỗi nhẹ ch1901 (SEQ ID NO: 36)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPK
LLIYGASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC;

kháng thể khảm ch1902:

chuỗi nặng ch1902 (SEQ ID NO: 37)

EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG
MIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKT
GNSFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

Chuỗi nhẹ ch1902 (SEQ ID NO:38)

DIVLTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCQNAYTYPFTF

SGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC.

Bảng 9. Kháng thể mAb1901 được làm tương thích với người

Chuỗi nặng Chuỗi nhẹ	H1	H2	H3	H4
L1	h1901-1	h1901-2	h1901-3	h1901-4
L2	h1901-5	h1901-6	h1901-7	h1901-8
L3	h1901-9	h1901-10	h1901-11	h1901-12

Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ là như sau:

Bảng 10. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1901

Tên chuỗi nhẹ/chuỗi nặng (SEQ ID NO:)	Trình tự
L1 (SEQ ID NO: 39)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLA WYQQKPGQPPLKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
L2 (SEQ ID NO:40)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLA WYQQKPGQPPLKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLT LQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
L3 (SEQ ID NO: 41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLA WYQQKPGQPPLKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLT LQAEDVAIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
H1 (SEQ ID NO: 42)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLR AEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGT TTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV

	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
H2 (SEQ ID NO:43)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYL QMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
H3 (SEQ ID NO: 44)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYL QMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
H4 (SEQ ID NO:45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNSLY LQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

Bảng 11. Kháng thể được làm tương thích với người mAb1902

Chuỗi nặng Chuỗi nhẹ	H11	H12	H13	H14
L11	h1902-1	h1902-2	h1902-3	h1902-4
L12	h1902-5	h1902-6	h1902-7	h1902-8
L13	h1902-9	h1902-10	h1902-11	h1902-12

Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ là như sau:

Bảng 12. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb1901

Tên chuỗi nhẹ/chuỗi nặng (SEQ ID NO:)	Trình tự
L11 (SEQ ID NO: 46)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
L12 (SEQ ID NO: 47)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
L13 (SEQ ID NO:48)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC
H11 (SEQ ID NO: 49)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQRLEWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H12 (SEQ ID NO: 50)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQRLEWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTITLTKSASTAYME

	LSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H13 (SEQ ID NO:51)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMEL SSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H14 (SEQ ID NO: 52)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQR PGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMEL SSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Kháng thể đối chứng dương theo sáng chế là IMAB-362 (được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2016166122):

Chuỗi nặng IMAB-362 (SEQ ID NO: 53)

1 QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWINWVKQR PGQGLEWIGN
51 IYPSDSYTN Y NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSPTSED SAVYYCTRSW
101 RGNSFDYWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251 TLMISRTEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVL
401 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK.

Chuỗi nhẹ IMAB-362 (SEQ ID NO: 54)

1 DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP

51 KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLA VYYCQNDYSY
 101 PFTFGSGTKL EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA
 151 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC
 201 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC.

Các kháng thể nêu trên được tách dòng, biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp biểu hiện tái tổ hợp và tách dòng gen thông thường.

Đánh giá sinh học *in vitro*

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm gắn kết ELISA ở cấp độ tế bào

Thử nghiệm ELISA trên cơ sở tế bào được sử dụng để phát hiện đặc tính gắn kết của kháng thể kháng Claudin 18.2. Các tế bào NUGC4 biểu hiện ổn định Claudin 18.2 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ (Corning, 3599), cho đến khi mật độ phát triển tế bào đạt tới mức 90%, 4% paraformaldehyt được bổ sung để cố định các tế bào trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch đệm PBST (PBS chứa 0,05% Tween-20, pH 7,4) trong 3 lần, và sau đó được phong bế bằng cách bổ sung 200µl/lỗ 5% sữa gầy (bột sữa gầy Bright) được pha loãng bằng PBS dưới dạng dung dịch phong bế, và ủ trong tủ ủ 37°C trong 2,5 giờ hoặc 4°C qua đêm (16-18 giờ). Sau khi phong bế, dung dịch phong bế được loại bỏ và đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm PBST, 50µl/lỗ kháng thể thử nghiệm đã pha loãng bằng dung dịch pha loãng mẫu (PBS chứa 1% sữa gầy, pH7,4) được bổ sung, và được đặt trong tủ ủ 37°C trong 2 giờ. Sau khi ủ xong, đĩa được rửa trong 5 lần bằng PBST, 100µl/lỗ kháng thể thứ cấp của dê kháng người được đánh dấu HRP (Jackson Immuno Research, Cat No. 109-035-003) đã pha loãng bằng dung dịch pha loãng mẫu được bổ sung, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa 6 lần bằng PBST, 50µl/lỗ cơ chất sinh màu TMB (KPL, Cat No. 52-00-03) được bổ sung, ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10-15 phút, và 50µl/lỗ 1M H₂SO₄ được bổ sung để dừng phản ứng. Giá trị hấp thụ được đọc bằng thiết bị đọc vi đĩa MD Versa Max TM ở bước sóng 450 nm, và giá trị EC₅₀ thể hiện kháng thể Claudin18.2 gắn kết với Claudin18.2 được tính toán (Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây).

Bảng 13. Hoạt tính gắn kết của kháng thể

Kháng thể	IMAB362	ch1901	ch1902
E _{max}	1,175	1,399	1,272
EC ₅₀ (nM)	0,108	0,098	0,074

Bảng 14-1. Hoạt tính gắn kết của kháng thể được làm tương thích với người
mAb1901

Kháng thể	Emax	EC50 (nM)
IMAB362	1,115	0,086
h1901-2	1,039	0,076
h1901-3	1,1055	0,22
h1901-4	0,986	0,201
h1901-6	0,937	0,091
h1901-7	0,921	0,166
h1901-8	1,047	0,091
h1901-11	1,44	0,076
h1901-12	1,22	0,116

Bảng 14-2. Hoạt tính gắn kết của kháng thể được làm tương thích với người
mAb1902

Kháng thể	Emax	EC50 (nM)
IMAB362	0,88	0,187
h1902-1	0,87	0,113
h1902-2	0,88	0,107
h1902-3	0,84	0,175
h1902-4	0,82	0,087
h1902-5	0,9	0,098
h1902-6	0,78	0,141
h1902-7	0,75	0,121
h1902-8	0,89	0,132
h1902-9	0,75	0,137
h1902-10	0,89	0,133

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm gắn kết của các kháng thể ở cấp độ tế bào 1×10^6 /ml huyền phù tế bào được chuẩn bị với các tế bào NUGC4 biểu hiện ổn định Claudin 18.2 và dung dịch đệm FACS (2% huyết thanh bào thai bò (Gibco, 10099141) trong PBS (Sigma, P4417-100TAB), pH7,4), và được bổ sung vào đĩa có đáy tròn có 96 lỗ (Corning, 3795) ở nồng độ 100µl/lỗ. Sau khi ly tâm để loại bỏ dịch nổi, các nồng độ khác nhau của kháng thể kháng Claudin 18.2 thử nghiệm được pha loãng bằng dung dịch đệm FACS được bổ sung ở nồng độ 50µl/lỗ, và ủ trong 1 giờ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối. Sau khi ly tâm và rửa bằng dung dịch đệm FACS ở tốc độ 300g trong 3 lần, nồng độ làm việc của IgG kháng

người được phủ Alexa Fluor 488 (H+L) (invitrogen, A-11013) được bổ sung và ủ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 40 phút. Sau khi ly tâm và rửa bằng dung dịch đệm FACS ở tốc độ 300g trong 3 lần, cường độ huỳnh quang trung bình nhân được đo trên thiết bị đo dòng chảy tế bào BD FACS CantoII và giá trị EC50 thể hiện kháng thể Claudin 18.2 gắn kết với các tế bào NUGC4 biểu hiện ổn định Claudin 18.2 được tính toán. Các kết quả được thể hiện trong Fig.1.

Ví dụ thử nghiệm 3: thử nghiệm nhập bào các kháng thể

Kháng thể Claudin 18.2 thử nghiệm được đánh dấu sơ bộ bằng este DyLight 488 NHS (thermofisher, 46403) được bổ sung vào 1×10^6 /ml tế bào NUGC4 biểu hiện ổn định Claudin 18.2 ở nồng độ cuối bằng 5 µg/ml, và đặt trên đá trong khi ủ trong 1 giờ trong bóng tối, ly tâm và rửa 3 lần bằng dung dịch đệm FACS đã làm lạnh sơ bộ (2% huyết thanh bào thai bê trong PBS, pH 7,4), sau khi loại bỏ dịch nổi, môi trường đầy đủ đã làm ấm sơ bộ được bổ sung, và đặt trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào được lấy ra sau 0, 0,5, 1, 2, và 4 giờ tương ứng, và đặt trên đá trong bóng tối. Sau khi toàn bộ các mẫu được thu gom, ly tâm ở tốc độ 300g ở nhiệt độ thấp, dung dịch đệm giải hấp (0,05M glyxin, 0,1M natri clorua, pH1,7) được bổ sung và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 7 phút. Các mẫu được ly tâm và rửa bằng dung dịch đệm FACS ở tốc độ 300g trong 1 lần, cường độ huỳnh quang trung bình nhân được đo trên thiết bị đo tế bào dòng chảy BD FACS CantoII, và hiệu suất nhập bào của kháng thể Claudin 18.2 đối với tế bào NUGC4 biểu hiện ổn định Claudin 18.2 được tính toán. Các kết quả cho thấy (xem Fig.2) rằng các kháng thể được làm tương thích với người có hiệu suất nhập bào thích hợp.

Ví dụ thử nghiệm 4: Xác định ái lực kháng thể dựa trên kỹ thuật đo tế bào dòng chảy

Vào ngày thử nghiệm, các tế bào HEK293/hClaudin18.2 được thu gom trong đĩa có đáy hình chữ U có 96 lỗ, với mật độ 1×10^5 đến 2×10^5 tế bào mỗi lỗ. Kháng thể Claudin 18.2 được bổ sung, với nồng độ ban đầu bằng 5µg/ml, pha loãng $2 \times$ gradien (12 điểm nồng độ), và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ. Đối chứng dương là IMAB362, và lỗ không có kháng thể được đặt làm đối chứng âm. Kháng thể được loại bỏ bằng cách ly tâm, và sau đó 100µl/lỗ FITC kháng thể kháng Fc IgG của người (200×) được bổ sung, ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút trong bóng tối, rửa hai

lần bằng PBS+2% FBS, và chuẩn bị để phát hiện bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy. BD FACS CantoII được bắt đầu và được gia nhiệt sơ bộ, một thử nghiệm mới được thiết lập bằng phần mềm BD FACSDiva. Mẫu đối chứng âm HEK293/hClaudin18.2 được phát hiện, và điện thế FSC và SSC được điều chỉnh đến các giá trị thích hợp và được lưu lại. Mẫu trống B và đường cong chuẩn 1 được phát hiện tương ứng theo hướng dẫn của kit Quantum™ FITC-5 MESF. Điện thế FITC được điều chỉnh đến giá trị thích hợp và được lưu lại. Các mẫu trong đĩa đáy chữ U có 96 lỗ được phát hiện trong điều kiện điện thế đã lưu lại, và số liệu được ghi lại. Phần mềm Flowjo được sử dụng để phân tích số liệu thử nghiệm để thu được giá trị trung bình nhân, và đường cong chuẩn MESF-giá trị trung bình nhân được khớp theo hướng dẫn của kit Quantum™ FITC-5 MESF. Nồng độ mol của kháng thể Claudin18.2 gắn kết với các tế bào HEK293/hClaudin18.2 và nồng độ của kháng thể tự do được tính toán dựa trên giá trị cường độ huỳnh quang của kháng thể kháng Fc IgG của người FITC, và Bmax và hằng số phân ly KD của kháng thể được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp lập đồ thị Scatchard. Các kết quả được thể hiện trong bảng 15.

Bảng 15. Ải lực của kháng thể được làm tương thích với người ở cấp độ tế bào

Kháng thể	IMAB362	h1901-11	h1902-5
KD (nM)	10,2	6,8	1,64

Ví dụ thử nghiệm 5: Đánh giá tác dụng ADCC của kháng thể

Các tế bào NUGC4 khác nhau (biểu hiện Claudin 18.2 ở mức cao, trung bình và thấp) được phân cắt, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút, và tái huyền phù để đếm. Các tế bào được tái huyền phù trong RPMI 1640 không chứa phenol đỏ (Gibco, CAT# 11835-030) chứa 10% FBS (New Zealand Ultra-low IgG Fetal Bovine Serum, Gibco, 1921005PJ) ở mật độ 3×10^5 tế bào/ml. 25µl tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Corning, 3903), 7500 tế bào/lỗ. Kháng thể được pha loãng trong môi trường không chứa phenol đỏ nêu trên để chuẩn bị dung dịch pha loãng kháng thể 3×, và 25µl/lỗ kháng thể được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào và ủ ở nhiệt độ 37°C, tủ ủ 5% CO₂ trong 0,5 giờ.

Các tế bào hiệu ứng (tế bào FcR3A-V158-NFAT-RE-Jurkat) được thu gom,

ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút, và tái huyền phù để đếm. Các tế bào được tái huyền phù trong RPMI 1640 không chứa phenol đỏ chứa 10% FBS (huyết thanh bào thai bò có hàm lượng IgG siêu thấp New Zealand) ở mật độ 3×10^6 tế bào/ml, và 25 μ l tế bào được bổ sung vào đĩa thử nghiệm ($7,5 \times 10^4$ tế bào/lỗ) và ủ ở nhiệt độ 37°C, tủ ủ 5% CO₂ trong 6 giờ.

75 μ l/lỗ Bright-Glo (Promega, E2610) được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa thử nghiệm, và sự phát quang hóa học được phát hiện bằng thiết bị đọc vi đĩa (PerkinElmer, VITOR3).

Các kết quả chỉ ra rằng (xem Bảng 16 và Fig.3A-Fig.3C) cả kháng thể h1901-11 và h1902-5 đều có ái lực ADCC rất mạnh ở các tế bào NUGC4 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức thấp, trung bình và cao.

Bảng 16. Các tác động ADCC của các kháng thể ở tế bào NUGC4 với mức biểu hiện Claudin 18.2 khác nhau

Mức biểu hiện Claudin 18.2 trong NUGC4		h1901-11	h1902-5	IMAB362
Mức biểu hiện thấp	IC50 (ng/ml)	22,42	35,46	183,4
Mức biểu hiện trung bình	IC50 (ng/ml)	15,35	30,00	210,4
Mức biểu hiện cao	IC50 (ng/ml)	26,17	32,16	132,6

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng.

2. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể chuột, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

3. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 2, mà là kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng khung có nguồn gốc từ kháng thể người hoặc biến thể vùng khung của chúng, và biến thể vùng khung có từ 1 đến 10 đột biến ngược trên vùng khung chuỗi nhẹ của kháng thể người và/hoặc vùng khung chuỗi nặng.

4. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 3, trong đó kháng thể này bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược được chọn từ nhóm bao gồm 4L và 22S được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và/hoặc một hoặc nhiều đột biến ngược được chọn từ nhóm bao gồm 38K, 40R, 48I, 66K, 67A, 69L, 71L và 73K được bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng.

5. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 2, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện dưới đây:

trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6; hoặc

trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 31, 32, 33 hoặc 34 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 28, 29 hoặc 30.

6. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 5, trong đó kháng thể kháng Claudin 18.2 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện dưới đây:

trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 31 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO:29.

7. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 6, trong đó kháng thể này còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ.

8. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 7, trong đó vùng cố định chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm (các) vùng cố định IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người và (các) biến thể của chúng.

9. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 8, trong đó vùng cố định chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm (các) vùng cố định chuỗi κ và λ của kháng thể người và (các) biến thể của chúng.

10. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 9, trong đó kháng thể kháng Claudin 18.2 bao gồm vùng cố định chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và vùng cố định chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

11. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 10, bao gồm:

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 37 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 38; hoặc

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 49, 50, 51 hoặc 52 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 46, 47 hoặc 48.

12. Kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm 11, bao gồm:

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 49 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 47.

13. Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.

14. Tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic theo điểm 13.

15. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, trong đó thể tiếp hợp này là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất được tạo thành bằng cách tiếp hợp kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 với dược chất gây độc tế bào.

16. Dược phẩm, trong đó dược phẩm này chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 15, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, dung dịch đệm hoặc tá dược dược dụng.

17. Kit chứa kháng thể kháng Claudin 18.2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.

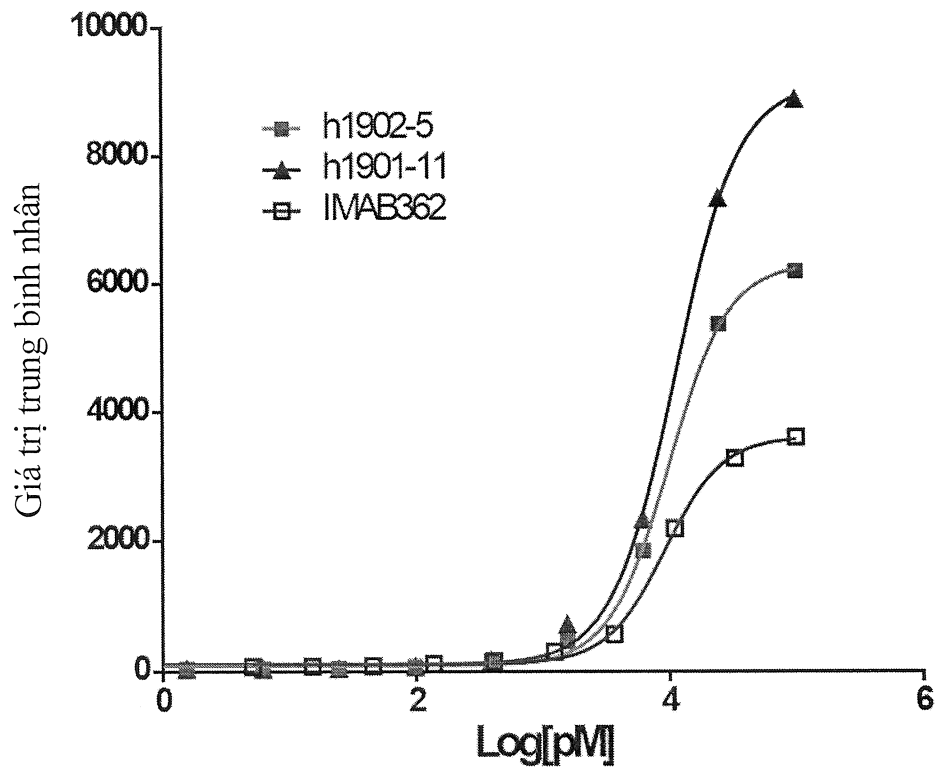


Fig.1

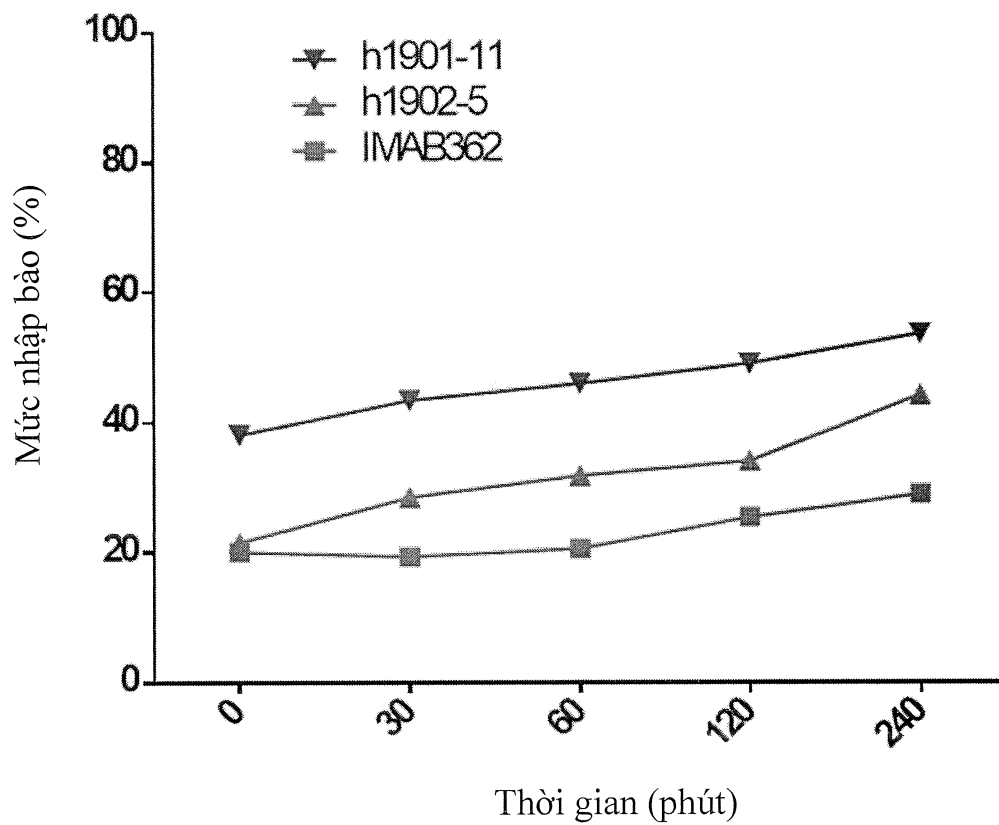


Fig.2

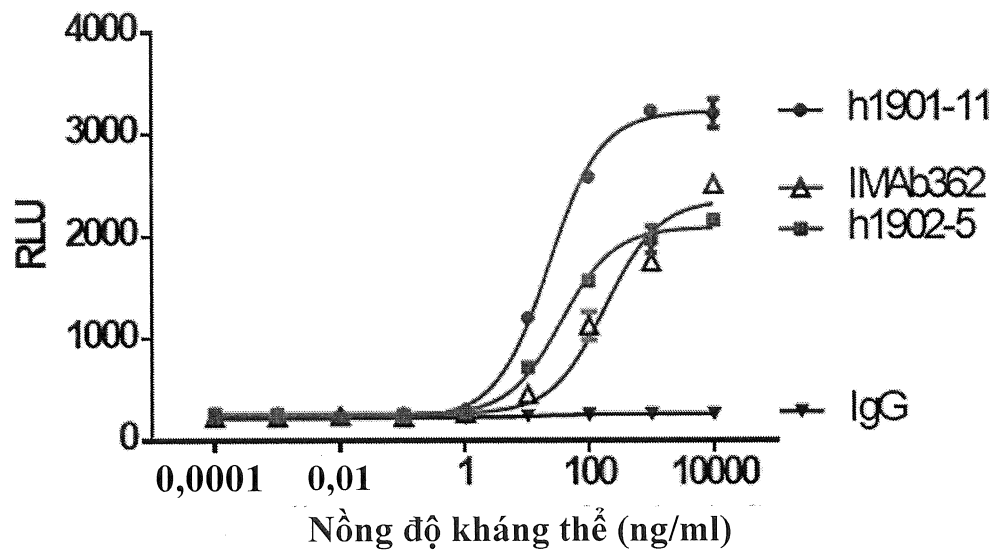


FIG.3A

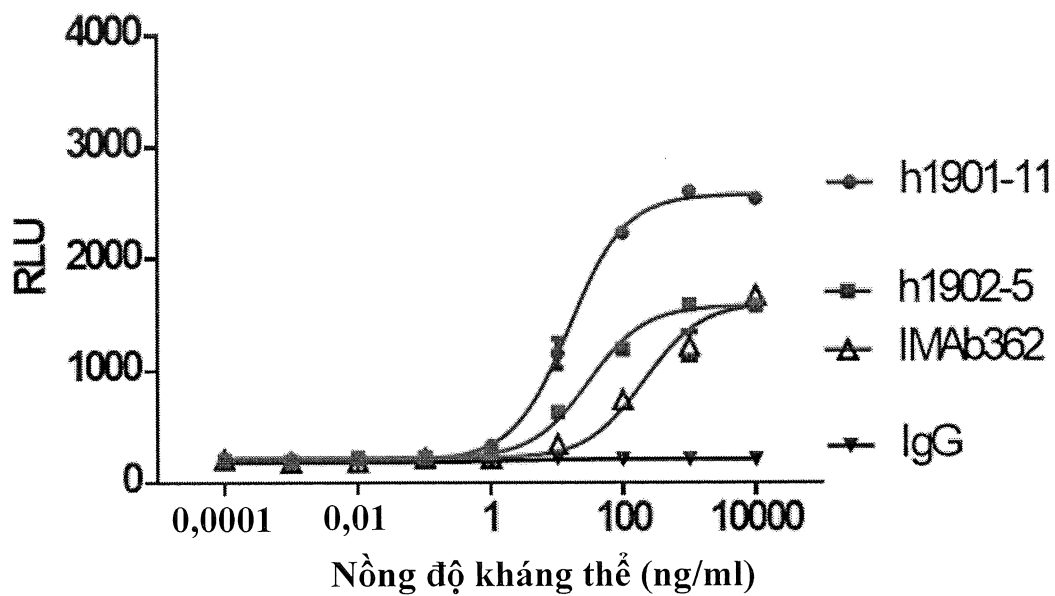


FIG.3B

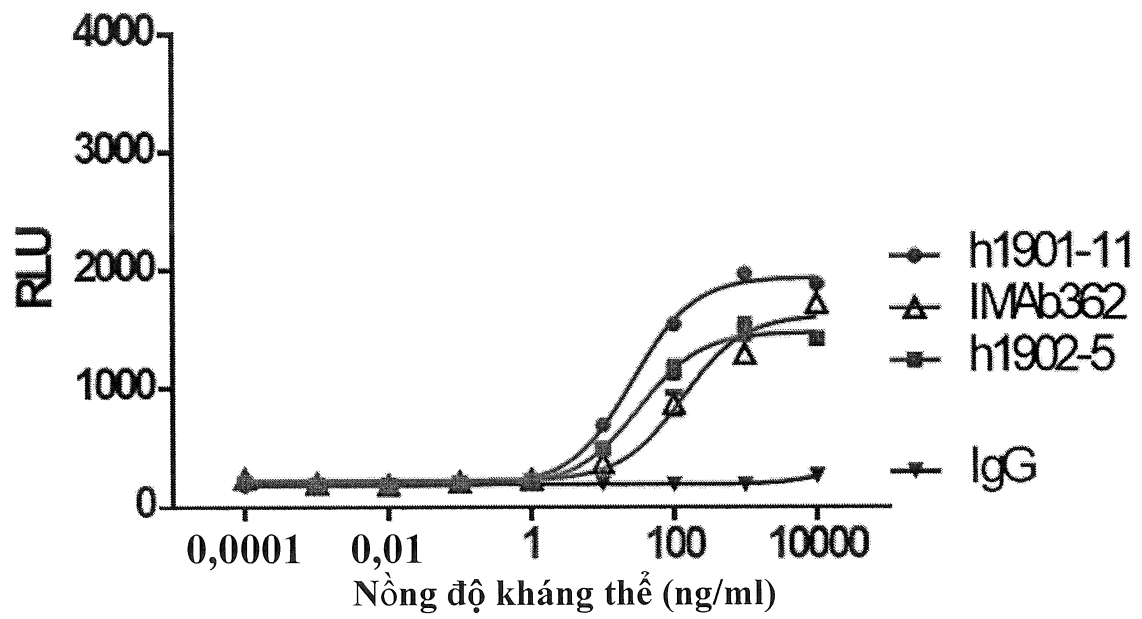


Fig.3C

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.;
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
- <120> KHÁNG THỂ KHÁNG CLAUDIN 18.2, THỂ TIẾP HỢP, DƯỢC PHẨM VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
- <130> 702029CPCP
- <140> PCT/CN2020/082369
- <141> 2020-03-31
- <150> 201910257853.6
- <151> 2019-04-01
- <160> 54
- <170> Danh mục trình tự SIPO 1.0
- <210> 1
- <211> 261
- <212> PRT
- <213> Người hiện đại
- <220>
- <221> PEPTIT
- <223> Protein Claudin18.2
- <400> 1
Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15
Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30
Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45
Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60
Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80
Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95
Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125
Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160
Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175
Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190
Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205
Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220
Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240
Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser

245
Lys His Asp Tyr Val
260

250

255

<210> 2
<211> 3350
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> gen
<223> Claudin18.2

<400> 2
agaattgcgc tgtccacttg tctgtgtggct ctgtgtgcgac actgtgcgcc accatggcgc 60
tgactgcctg tcagggcctg ggggttcgtgg ttctactgat tgggattgcg ggcacattg 120
ctgccacctg catggaccag tggagcaccc aagacttgta caacaacccc gtaacagctg 180
ttttcaacta ccaggggctg tggcgctcct gtgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240
gccggggcta cttcaccctg ctggggctgc cagccatgct gcaggcagtg cgagccctga 300
tgatcgtagg catcgctcctg ggtgccattg gcctcctggg atccatcttt gccctgaaat 360
gcacccgcac tggcagcatg gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acctccggga 420
tcattgttcat tgtctcaggt ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccacatgc 480
tgggtgactaa cttctggatg tccacagcta acatgtacac cggcatgggt gggatggtgc 540
agactgttca gaccaggtac acatttggtg cggctctggt cgtgggctgg gtcgctggag 600
gcctcacact aattgggggt gtgatgatgt gcacgcctg ccggggcctg gcaccagaag 660
aaaccaacta caaagcgtt tcttatcatg cctcaggcca cagtgttgcc tacaagcctg 720
gaggcttcaa ggccagcact ggctttgggt ccaacaccaa aaacaagaag atatacgatg 780
gagggtgccg cacagaggac gaggtacaat cttatccttc caagcacgac tatgtgtaat 840
gctctaagac ctctcagcac gggcggaaga aactcccga gagctcacc aaacaaacag 900
gagatcccat ctagattttt tcttgctttt gactcacagc tggaggttag aaagcctcg 960
atttcatctt tggagaggcc aaatggtctt agcctcagtc tctgtctcta aatattccac 1020
cataaaacag ctgagttatt tatgaattag aggctatagc tcacattttc aatcctctat 1080
ttcttttttt aaatataact ttctactctg atgagagaat gtgggtttta tctctctctc 1140
acattttgat gatttagaca gactccccct cttcctccta gtcaataaac ccattgatga 1200
tctattttcc agcttatccc caagaaaact tttgaaagga aagagtagac ccaaagatgt 1260
tattttctgc tgtttgaatt ttgtctcccc acccccact tggctagtaa taaacactta 1320
ctgaagaaga agcaataaga gaaagatat ttgtaatctc ccagcccatg atctcggttt 1380
tcttacactg tgatcttaaa agttaccaa ccaaagtcac ttctcagttg aggcaaccaa 1440
acctttctac tgctgttgac atcttcttat tacagcaaca ccattctagg agtttcctga 1500
gctctccact ggagtcctct ttctgtcgcg ggtcagaaat tgtccctaga tgaatgagaa 1560
aattattttt tttaatttaa gtccataata tagttaaaat aaataatgtt ttagtaaaat 1620
gatacactat ctctgtgaaa tagcctcacc cctacatgtg gatagaagga aatgaaaaaa 1680
taattgcttt gacattgtct atatggtact ttgtaaagtc atgcttaagt acaaatcca 1740
tgaaaagctc actgatccta attctttccc tttgaggctc ctatggctct gattgtacat 1800
gatagtaagt gtaagccatg taaaaagtaa ataattgtct ggcacagtgg ctcacgcctg 1860
taatcctagc actttgggag gctgaggagg aaggatcact tgagcccaga agttcgagac 1920
tagcctgggc aacatggaga agccctgtct ctacaaaata cagagagaaa aaatcagcca 1980
gtcatggtgg cctacacctg tagtcccagc attccgggag gctgagggtg gaggatcact 2040
tgagcccagg gaggttgggg ctgcagtgag ccatgatcac accactgcac tccagccagg 2100
tgacatagcg agatcctgtc taaaaaata aaaaaataat aatggaacac agcaagtcct 2160
aggaagttag ttaaaactaa ttctttaaaa aaaaaaaa gttgagcctg aattaaatgt 2220
aatgtttcca agtgacaggt atccacattt gcatgggttac aagccactgc cagtttagcag 2280
tagcactttc ctggcactgt ggtcgggttt gttttgtttt gctttgttta gagacgggggt 2340
ctcactttcc aggtctggcct caaactcctg cactcaagca attcttctac cctggcctcc 2400
caagtagctg gaattacagg tgtgcgccat cacaactagc tgggtggtcag ttttgttact 2460
ctgagagctg ttactttctc tgaattcacc tagagtgggt ggaccatcag atgtttgggc 2520
aaaactgaaa gctctttgca accacacacc ttccctgagc ttacatcact gcccttttga 2580
gcagaaagtc taaattcctt ccaagacagt agaattccat ccagtagcca aagccagata 2640
ggccccctag gaaactgagg taagagcagt ctctaaaaac taccacagc agcattgggtg 2700
caggggaact tggccattag gttattatct gagaggaaag tcctcacatc aatagtacat 2760
atgaaagtga cctccaaggg gattggtgaa tactcataag gatcttcagg ctgaacagac 2820

```
tatgtctggg gaaagaacgg attatgcccc attaaataac aagttgtgtt caagagtcag 2880
agcagtgagc tcagaggccc ttctcactga gacagcaaca tttaaaccac accagaggaa 2940
gtatttgggg aactcactgc ctcagtttgg gtaaaggatg agcagacaag tcaactaaag 3000
aaaaaagaaa agcaaggagg agggttgagc aatctagagc atggagtttg ttaagtgtct 3060
tctggatttg agttgaagag catccatttg agttgaaggc cacagggcac aatgagctct 3120
cccttctacc accagaaagt ccctgggtcag gtctcaggta gtgcggtgtg gctcagctgg 3180
gtttttaatt agcgcattct ctatccaaca ttttaattgt tgaaagcctc catatagtta 3240
gattgtgctt tgtaattttg ttgttgttgc tctatcttat tgtatatgca ttgagtatta 3300
acctgaatgt tttgttactt aaatattaaa aacactgtta tcctacagtt 3350
```

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột mAb1901

```
<400> 3
Glu Val Gln Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20          25          30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Met Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65          70          75          80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100          105          110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115          120
```

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột mAb1901

```
<400> 4
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20          25          30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35          40          45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50          55          60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr His Cys Gln Asn
85          90          95
Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
```

100 105 110
Lys

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột mAb1902

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

<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột mAb1902

<400> 6
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 7
<211> 330

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> MIỀN

<223> Vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể IgG1 người

<400> 7

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85      90      95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100     105     110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115     120     125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130     135     140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145     150     155     160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165     170     175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180     185     190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195     200     205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210     215     220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225     230     235     240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245     250     255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260     265     270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275     280     285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290     295     300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305     310     315     320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325     330

```

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> MIỀN

<223> Vùng cố định chuỗi nhẹ kappa của kháng thể người

<400> 8
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1901 HCDR1

<400> 9
 Asp Tyr Gly Ile His
 1 5

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

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1901 HCDR2

<400> 10
 Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

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

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1901 HCDR3

<400> 11
 Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1901 LCDR1

<400> 12
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1901 LCDR2

<400> 13
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1901 LCDR3

<400> 14
 Gln Asn Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> mAb1902 HCDR1

<400> 15
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN
<223> mAb1902 HCDR2

<400> 16
Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly Arg

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỄN
<223> mAb1902 HCDR3

<400> 17
Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỄN
<223> mAb1902 LCDR1

<400> 18
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Thr

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỄN
<223> mAb1902 LCDR2

<400> 19
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỄN
<223> mAb1902 LCDR3

<400> 20
 Gln Asn Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VL1

<400> 21
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VL2

<400> 22
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 23
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VL3

<400> 23
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr His Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VH1

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN
<223> VH2

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

<210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> VH3

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> VH4

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

```

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

```

<210> 28
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VL11

```

<400> 28
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
      20      25      30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35      40      45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50      55      60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      65      70      75      80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
      85      90      95
Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100      105      110
Lys

```

<210> 29
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VL12

```

<400> 29
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
      20      25      30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35      40      45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

```

```

      50      55      60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65      70      75      80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
      85      90      95
Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100      105      110
Lys

```

<210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VL13

```

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

```

<210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> VH11

```

<400> 31
Glu 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 Ser Tyr
      20      25      30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

```

100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỄN
 <223> VH12

<400> 32
 Glu 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỄN
 <223> VH13

<400> 33
 Glu 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34
 <211> 118

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> VH14

<400> 34
Glu 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 Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> CHUỖI
<223> Chuỗi nặng ch1901

<400> 35
Glu Val Gln Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Met Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 36
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Chuỗi nhẹ ch1901

<400> 36
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr His Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

```

145          150          155          160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215          220

```

```

<210> 37
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> Chuỗi nặng ch1902

```

```

<400> 37
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
          50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Pro Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
          115          120          125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
          130          135          140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145          150          155          160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
          165          170          175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
          180          185          190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
          195          200          205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
          210          215          220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225          230          235          240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
          245          250          255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
          260          265          270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
          275          280          285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
          290          295          300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305          310          315          320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

```

```

          325          330          335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
          340          345          350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
          355          360          365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
          370          375          380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385          390          395          400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
          405          410          415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
          420          425          430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445

```

<210> 38
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Chuỗi nhẹ ch1902

```

<400> 38
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
          20          25          30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35          40          45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50          55          60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn
          85          90          95
Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130          135          140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145          150          155          160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215          220

```

<210> 39
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> L1

<400> 39

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
          20           25           30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
          50           55           60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
          85           90           95
Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          130          135          140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145          150          155          160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215          220

```

<210> 40

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> L2

<400> 40

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
          20           25           30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
          50           55           60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
          85           90           95
Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

```

```

      130              135              140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145              150              155              160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
      165              170              175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
      180              185              190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
      195              200              205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210              215              220

```

```

<210> 41
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> L3

```

```

<400> 41
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
      20      25      30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35      40      45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
      50      55      60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      65      70      75      80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr His Cys Gln Asn
      85      90      95
Asp Leu Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100      105      110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
      115      120      125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
      130      135      140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
      145      150      155      160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
      165      170      175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
      180      185      190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
      195      200      205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210      215      220

```

```

<210> 42
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> H1

```

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 43

<211> 450

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> H2

<400> 43
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 44
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> H3

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

```

      355              360              365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370              375              380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385              390              395              400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
      405              410              415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
      420              425              430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      435              440              445
Gly Lys
      450

```

```

<210> 45
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> H4

```

```

<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20              25              30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65              70              75              80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Thr Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      100              105              110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
      115              120              125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
      130              135              140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
      145              150              155              160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      165              170              175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
      180              185              190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
      195              200              205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
      210              215              220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
      225              230              235              240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      245              250              255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      260              265              270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      275              280              285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

```

```

      290              295              300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305              310              315              320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      325              330              335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      340              345              350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
      355              360              365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
      370              375              380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385              390              395              400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
      405              410              415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
      420              425              430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      435              440              445
Gly Lys
      450

```

```

<210> 46
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> L11

```

```

<400> 46
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
      20              25              30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35              40              45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50              55              60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
      85              90              95
Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100              105              110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
      115              120              125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
      130              135              140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145              150              155              160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
      165              170              175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
      180              185              190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
      195              200              205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210              215              220

```

<210> 47
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> L12

<400> 47
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 48
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> L13

<400> 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

```

      85              90              95
Ala Tyr Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100              105              110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
      115              120              125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
      130              135              140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
      145              150              155              160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
      165              170              175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
      180              185              190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
      195              200              205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210              215              220

```

<210> 49
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> H11

```

<400> 49
Glu 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 Ser Tyr
      20      25      30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
      115      120      125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
      130      135      140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
      145      150      155      160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
      165      170      175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
      180      185      190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
      195      200      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
      210      215      220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
      225      230      235      240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      245      250      255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

```

```

      260      265      270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275      280      285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
      290      295      300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      305      310      315      320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      325      330      335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      340      345      350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355      360      365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      370      375      380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
      385      390      395      400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      405      410      415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      420      425      430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435      440      445

```

<210> 50
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> H12

```

<400> 50
Glu 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 Ser Tyr
      20      25      30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
      115      120      125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
      130      135      140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
      145      150      155      160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
      165      170      175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
      180      185      190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
      195      200      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

```

```

      210              215              220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225              230              235              240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      245              250              255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
      260              265              270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275              280              285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
      290              295              300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305              310              315              320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      325              330              335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      340              345              350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355              360              365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      370              375              380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385              390              395              400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      405              410              415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      420              425              430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435              440              445

```

<210> 51
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> H13

<400> 51
 Glu 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

```

                165                170                175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
                180                185                190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
                195                200                205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
                210                215                220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
                225                230                235                240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                250                255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                260                265                270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
                275                280                285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
                290                295                300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
                305                310                315                320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                330                335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                340                345                350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                355                360                365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
                370                375                380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
                385                390                395                400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                410                415
Arg Trp Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                420                425                430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                435                440                445

```

<210> 52
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> H14

```

<400> 52
Glu 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 Ser Tyr
                20                25                30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
                35                40                45
Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
                50                55                60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ala 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 Leu Lys Thr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                100                105                110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

```

```

      115              120              125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
      130              135              140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145              150              155              160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
      165              170              175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
      180              185              190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
      195              200              205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
      210              215              220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225              230              235              240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      245              250              255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
      260              265              270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275              280              285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
      290              295              300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305              310              315              320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      325              330              335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      340              345              350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355              360              365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      370              375              380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385              390              395              400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      405              410              415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      420              425              430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435              440              445

```

<210> 53
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Chuỗi nặng IMAB-362

<400> 53
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

```

65          70          75          80
Met Gln Leu Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
          115          120          125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
          130          135          140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145          150          155          160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
          165          170          175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
          180          185          190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
          195          200          205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
          210          215          220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225          230          235          240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
          245          250          255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
          260          265          270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
          275          280          285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
          290          295          300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305          310          315          320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
          325          330          335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
          340          345          350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
          355          360          365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
          370          375          380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385          390          395          400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
          405          410          415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
          420          425          430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445

```

<210> 54
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Chuỗi nhẹ IMAB-362

<400> 54
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

90