(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) **1-0050259**

(51)[7] **C07K 16/30**; A61K 39/395; A61P 35/00 (13) **B**

(21) 1-2015-02201
(22) 20/11/2013
(86) PCT/EP2013/074291 20/11/2013
(87) WO 2014/079886 A1 30/05/2014
(30) 12306444.6 20/11/2012 FR
(45) 25/08/2025 449
(43) 25/12/2015 333A
(73) SANOFI (FR)
54 rue La Boétie, F-75008 Paris, France
(72) BERNE, Pierre-Francois (FR); BLANCHE, Francis (FR); BOUCHARD, Hervé (FR); CAMERON, Béatrice (FR); DABDOUBI, Tarik (FR); DECARY, Stéphanie (FR); FERRARI, Paul (FR); RAK, Alexey (FR).
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH

(21) 1-2015-02201

(57) Sáng chế bộc lộ các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* cũng như các axit nucleic được phân lập, vectơ và các tế bào chủ chứa trình tự mã hóa các kháng thể đã nêu. Sáng chế cũng bộc lộ các thể liên hợp miễn dịch gồm các kháng thể đã nêu được liên hợp hoặc liên kết với tác nhân ức chế tăng trưởng, và với các dược phẩm bao gồm các kháng thể hoặc các thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Sáng chế còn mô tả việc dùng các kháng thể hoặc các thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế để điều trị bệnh ung thư hoặc cho các mục đích chẩn đoán.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với protein CECAM5 ở người và khỉ *Macaca fascicularis* cũng như axit nucleic được phân lập, tế bào vật chủ trung gian và vật chủ chứa trình tự mã hóa các kháng thể này. Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp miễn dịch gồm các kháng thể được liên hợp hoặc liên kết với một tác nhân ức chế tăng trưởng, và dược phẩm chứa các kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Sáng chế đề cập đến việc dùng các kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế vào mục đích điều trị ung thư hoặc với mục đích chẩn đoán bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên Carcino-embryonic (CEA) là glycoprotein tham gia vào quá trình kết dính tế bào. CEA lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1965 (Gold và Freedman, J Med Exp, 121, 439, 1965) như một protein thường được biểu hiện qua ruột của thai nhi trong sáu tháng đầu tiên của thai kỳ, và phát hiện thấy ở các bệnh ung thư tuyến tụy, gan và đại tràng. Họ CEA thuộc siêu họ globulin miễn dịch. Họ CEA này chứa 18 gen, được chia thành hai phân nhóm protein: phân nhóm phân tử kết dính tế bào liên quan đến kháng nguyên carcinoembryonic (CEACAM) và phân nhóm glycoprotein đặc trưng của thai kỳ (Kammerer & Zimmermann, BMC Biology 2010, 8:12).

Ở người, phân nhóm CEACAM gồm 7 loại: CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng CEACAM5 đồng nhất với CEA được phát hiện lần đầu, biểu hiện mạnh trên bề mặt của các tế bào khối u đại trực tràng, dạ dày, phổi, vú, tuyến tiền liệt, buồng trứng, cổ tử cung, và bàng quang và biểu hiện yếu trong một vài biểu mô bình thường như các tế bào biểu mô hình trụ và tế bào tiết hình trụ ở đại tràng, , các tế bào cổ nhầy trong dạ dày và các tế bào biểu mô vảy ở

thực quản và cổ tử cung (Hammarstrom et al, 2002, trong "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E.P. et al., AACC Press, Washington pp 375). Do vậy, CEACAM5 có thể tạo nên hướng điều trị phù hợp với các phương pháp điều trị hướng đến khối u cụ thể, chẳng hạn như các thể liên hợp miễn dịch. Sáng chế này cũng đề xuất các kháng thể đơn dòng chống lại CEACAM5, và cho thấy rằng chúng có thể được liên hợp với chất gây độc tế bào để tạo ra hoạt tính gây độc tế bào, có khả năng tiêu diệt các tế bào khối u trong ống nghiệm (*in vitro*) và để gây ra sự thoái hóa khối u trong cơ thể (*in vivo*).

Các miền ngoại bào của các loại thuộc họ CEACAM gồm có các miền dạng globulin miễn dịch (dạng Ig) tái lập, các miền này được phân thành 3 loại, A, B và N, theo tính tương đồng về trình tự. CEACAM5 chứa bảy miền như vậy, cụ thể là N, A1, B1, A2, B2, A3 và B3.

Một mặt, các miền CEACAM5 A1, A2 và A3, và mặt khác, các miền B1, B2 và B3, thể hiện tính tương đồng về trình tự cao, các miền A của CEACAM5 ở người cho thấy có từ 84 đến 87% cặp tương đồng về trình tự, và các miền B có từ 69 đến 80%. Thêm vào đó, các loại thuộc họ CEACAM ở người khác có các miền A và/hoặc B trong cấu trúc của chúng, cụ thể là CEACAM1, CEACAM 6, CEACAM7 và CEACAM8, thể hiện sự tương đồng với CEACAM5 ở người. Đặc biệt là, các miền A và B của protein CEACAM6 ở người thể hiện các tính tương đồng về trình tự với các miền A1 và A3, và với miền bất kỳ trong số các miền từ B1 đến B3 của CEACAM5 ở người, một cách tương ứng, các tính tương đồng về trình tự thậm chí còn cao hơn so với khi quan sát được giữa các miền A và các miền B của CEACAM5 ở người.

Nhiều kháng thể kháng CEA đã được tạo ra với mục đích chẩn đoán hoặc điều trị đích CEA. Tính đặc hiệu đối với các kháng nguyên có liên quan luôn được đề cập đến như là một vấn đề đáng quan tâm trong lĩnh vực này, ví dụ bởi Sharkey et al (1990, Cancer Research 50, 2823). Do các tính tương đồng đã đề cập ở trên, một số kháng thể được đề cập trước đây có thể thể hiện sự liên kết với các epitop lặp lại của CEACAM5 ở các miền globulin miễn dịch khác nhau,

thể hiện sự phản ứng chéo với các loại thuộc họ CEACAM khác như CEACAM1, CEACAM 6, CEACAM7, hoặc CEACAM8, không có tính đặc hiệu đối với CEACAM5. Tính đặc hiệu của kháng thể kháng CEACAM5 được mong muốn trong phương pháp điều trị đích CEA như vậy để nó liên kết với các tế bào khối u biểu hiện CEACAM5 ở người nhưng không liên kết với một số mô bình thường biểu hiện các loại thuộc họ CEACAM khác. Đáng lưu ý là CEACAM1, CEACAM6 và CEACAM8 đã được mô tả như được biểu hiện bởi bạch cầu trung tính ở người và loài linh trưởng (Ebrahimmnejad et al, 2000, Exp di Res, 260, 365; Zhao et al, 2004, J Immunol Methods 293, 207; Strickland et al, 2009 J Pathol, 218, 380), ở đó các loại CEACAM1, CEACAM6 và CEACAM8 này đã được chứng minh là điều chỉnh việc tạo bạch cầu hạt và đóng vai trò trong đáp ứng miễn dịch.

Liên hợp thuốc chứa kháng thể kháng CEACAM 6 đã được đề cập, như kháng thể kháng CEACAM6 maytansinoit được phát triển bởi Genentech (Strickland et al, 2009 J Pathol, 218, 380), kháng thể này được chứng minh là đem lại độc tính tạo máu phụ thuộc CEACAM 6 ở loài linh trưởng. Độc tính này là do sự tích tụ liên hợp thuốc chứa kháng thể trong tủy xương và sự suy thoái bạch cầu hạt và tiền chất tế bào của chúng, được các tác giả xem là mối quan tâm an toàn chính. Vì vậy, chính xác hơn là cho mục đích điều trị, phản ứng chéo của kháng thể kháng CEACAM5 với CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7, hoặc CEACAM8 có thể làm giảm chỉ số điều trị của hợp chất này bằng cách làm tăng độc tính trên các mô bình thường. Vì vậy, có lợi thế lớn trong việc có được các kháng thể đặc hiệu đối với CEACAM5 mà sẽ không phản ứng chéo với các phân tử khác của họ CEACAM, đặc biệt là để sử dụng làm liên hợp thuốc chứa kháng thể (ADC) hoặc với phương thức tác động bất kỳ khác đem lại kết quả trong việc tiêu diệt tế bào đích.

Hơn nữa, như CEACAM5 được mô tả là được biểu hiện trong một số mô tế bào bình thường, dù ở mức thấp, nhưng là quan trọng để phát triển các kháng thể kháng CEACAM5 có khả năng liên kết với CEACAM 5 ở người cũng như với CEACAM5 ở khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis* - khỉ đuôi dài), các

kháng thể như vậy có thể được thử nghiệm dễ dàng trong các nghiên cứu về độc tính ở giai đoạn tiền lâm sàng ở khỉ cynomolgus để đánh giá hồ sơ an toàn của chúng. Bởi vì nó được chứng minh rằng hiệu quả của các kháng thể điều trị này có thể phụ thuộc vào sự định vị của epitop trong đích, cả trong trường hợp của các kháng thể chức năng (Doern et al. 2009, J. Biol. Chem 284 10254) và trong trường hợp có liên quan đến các chức năng phản ứng lại kích thích (Beers et al. Semin Hematol 47:107-1 14), kháng thể phản ứng chéo ở người/khỉ được chứng minh là liên kết các epitop trong cùng miền tương đồng dạng Ig lặp đi lặp lại của các protein ở người và ở khỉ cynomolgus.

Việc kết hợp nhu cầu đối với phản ứng chéo giữa các loài của các kháng thể như vậy với tính đặc hiệu của CEACAM5 ở người và khỉ *Macaca fascicularis*, tức là không có phản ứng chéo với các loại CEACAM khác ở khỉ *Macaca fascicularis* và ở người, tăng thêm độ phức tạp, mang lại các tính tương đồng về trình tự nói chung giữa các protein CEACAM ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Thật vậy, sự sắp xếp theo cặp chung của trình tự CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* với trình tự CEACAM5 ở người (AAA51967.1/GI: 180.223, 702 axit amin) chỉ ra rằng chỉ có tính tương đồng 78,5%. Các gen CEACAM1, CEACAM5 và CEACAM6 ở khỉ *Macaca fascicularis* được nhân bản và sự sắp xếp chung của các miền A, B và N ở người và khỉ *Macaca fascicularis* được thực hiện. Sự sắp xếp này dự đoán rằng có rất ít vùng, nếu có, để định vị một epitop lý tưởng chung cho CEACAM5 ở người và khỉ và không được chia sẻ với bất kỳ loại nào khác trong họ. Vì những lý do này, việc phát triển các kháng thể phản ứng chéo giữa CEACAM 5 ở người và khỉ *Macaca fascicularis* mà không có phản ứng chéo với các loại khác trong họ CEACAM ở người và khỉ *Macaca fascicularis* được dự kiến là sẽ có xác suất thành công thấp.

Đáng chú ý, các kháng thể kháng CEACAM5 được mô tả trước đây hầu như không bao giờ được dẫn chứng đối với phản ứng chéo ở khỉ *Macaca fascicularis*, với rất ít trường hợp ngoại lệ (MT111, xem bên dưới).

Các kháng thể kháng CEACAM5 đã được dùng trong các thử nghiệm lâm sàng, như Immusomedics labetuzumab (còn được gọi là hMN14, Sharkey et al, 1995, Cancer Research 55, 5935). Kháng thể này đã cho thấy là không liên kết với các kháng nguyên liên quan (Blumenthal et al., Cancer Research,vol. 65, no. 19, 2005, 8809-8817), nhưng cũng không phản ứng chéo với CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*. Đáng chú ý, kháng thể MT111 của Micromet (còn được gọi là kháng thể MEDI-565 của MedImmune) là kháng thể đặc hiệu kép liên kết với CEACAM5 và CD3 ở người (Peng et al., PLoS ONE 7 (5):e3641; WO 2007/071426). MT111 được cho là đã được tạo ra bởi sự hợp nhất của đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv) từ kháng thể nhận biết CEACAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus với scFv từ kháng thể nhận biết CD3 ở người (Quảng cáo của Oberst et al., AACR Annual Meeting April 2009 Denver, CO). Cũng có báo cáo rằng MT111 không liên kết với các loại khác của họ CEACAM (Peng et al, PLoS ONE 7 (5): e3641). MT111 liên kết với epitop về hình dạng trong miền A2 của CEACAM5 ở người. Epitop về hình dạng này bị mất trong biến thể ghép nối của CEACAM5 ở người, được biểu hiện đồng thời với CEACAM5 có chiều dài đầy đủ trên khối u (Peng et al., PLoS ONE 7(5):e3641). Ngoài ra, không có bằng chứng cho thấy MT111 liên kết với các epitop tương tự trong CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Trong nỗ lực để tạo ra các kháng thể mới chống lại protein bề mặt CEACAM5 với các đặc tính tối ưu để dùng vào mục đích điều trị, các tác giả sáng chế đã gây miễn dịch chuột với các protein tái tổ hợp và với các tế bào khối u. Họ đã sàng lọc hàng trăm tế bào lai bằng phương pháp ELISA trên nhiều protein tái tổ hợp của họ CEACAM, và dòng tế bào học với các dòng tế bào có liên quan, chỉ để chọn các globulin miễn dịch (IgG) với đặc tính thuận lợi. Thật không ngờ, họ đã có thể chọn các bản sao tế bào lai n và tạo ra các IgG trưởng thành tương ứng có tất cả các đặc tính mong muốn. Chúng liên kết đặc hiệu với miền A3-B3 của CEACAM5 ở người với ái lực cao và không nhận biết các protein CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 và CEACAM8 ở người. Trong phạm vi tế bào, các kháng thể này hiển thị ái lực cao đối với các tế bào khối u

(trong phạm vi nano). Hơn nữa, các kháng thể này cũng liên kết với protein CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* với tỉ lệ ái lực khỉ/người nhỏ hơn hoặc bằng 10. Các kháng thể của sáng chế liên kết đặc hiệu với miền A3-B3 của CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* và không nhận biết các loại khác trong họ CEACAM ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Bằng việc nhắm mục tiêu vào miền A3-B3 của CEACAM5, các kháng thể này làm tăng khả năng nhằm vào khối u, bởi chúng có khả năng liên kết với cả CECAM5 ở người có chiều dài đầy đủ và với biến thể ghép nối của nó được xác định bởi Peng et al. (PLoS ONE 7(5): e3641).

Cuối cùng, CEACAM5 được mô tả trong tài liệu là một protein bề mặt tiếp thu kém (xem lại trong Schmidt et al, 2008, Cancer Immunol. Immunother. 57, 1879), và do đó có thể không phải là mục tiêu thuận lợi cho các liên hợp thuốc chứa kháng thể. Bất chấp những nội dung đã được báo cáo trong tình trạng kỹ thuật trước đó, các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng các kháng thể họ đã tạo ra có thể tiếp thu phức hệ kháng thể CEACAM5 sau khi liên kết, và tạo ra hoạt tính gây độc tế bào trên các tế bào khối u trong ống nghiệm khi kết hợp với chất gây độc tế bào. Các kháng thể tương tự kết hợp với chất gây độc tế bào cũng có thể ngăn chặn rõ rệt sự phát triển của khối u ở chuột mang các khối u đại tràng và dạ dày nguyên phát của người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như được sử dụng trong tài liệu này "CEACAM5" để chỉ "phân tử kết dính tế bào liên quan đến kháng nguyên carcinoembryonic 5", còn được gọi là "CD66e" (Cụm biệt hóa 66e) hoặc CEA. CEACAM5 là glycoprotein tham gia kết dính tế bào. CEACAM5 được biểu hiện đặc biệt cao trên bề mặt của các tế bào ung thư ruột, dạ dày, phổi và tử cung.

Trình tự tham chiếu của CECAM5 ở người có chiều dài đầy đủ, chứa peptit tín hiệu (vị trí 1-34) và propeptit (vị trí 686-702), có sẵn từ cơ sở dữ liệu GenBank theo số truy cập AAA51967.1 (SEQ ID NO: 52). Năm SNPs không tương đồng đã được xác định với tần suất cao hơn 2% ở cộng đồng dân da trắng, bốn trong số đó được khu trú ở miền N (tại các vị trí 80, 83, 112, 113), SNP cuối

ở miền A2 (tại vị trí 398) của CECAM5 ở người (SEQ ID NO: 58). Trình tự có số truy cập AAA51967.1 của cơ sở dữ liệu GenBank chứa haplotype chính (I80, V83, I112, I113 và E398).

Trình tự của miền ngoại bào của CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*, đã được nhân bản bởi các tác giả sáng chế, được bộc lộ trong trong SEQ ID NO: 53.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Đánh giá sự chọn lọc của các kháng thể kháng CEACAM5.

Hình 2: Miền lập bản đồ của các kháng thể kháng CEACAM5 trên CEACAM5 ở người.

Hình 3: Miền lập bản đồ của các kháng thể kháng CEACAM5 trên CEACAM5 ở khỉ cynomolgus.

Hình 4: Đánh giá hoạt động chống khối u của các phức hợp chMAb4-SPDB-DM4, chMAbl-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4, và chMAb2-SPDB-DM4 chống lại ung thư biểu mô tuyến ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở chuột cái SCID.

Hình 5: Đánh giá hoạt động chống khối u của các phức hợp huMAb2-3-SPDB-DM4, huMAb2-4-SPDB-DM4 và chMAb2-SPDB-DM4 chống lại ung thư biểu mô tuyến ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở chuột cái SCID.

Hình 6: Đánh giá hoạt động chống khối u của phức hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 chống lại ung thư biểu mô tuyến dạ dày nguyên phát ở người STO-IND-006 ở chuột cái SCID.

Hình 7: trình tự sắp xếp của các vùng VH và VL của các kháng thể MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5.

Hình 8: phân tích HRMS của thể liên hợp chMAb1 -SPDB-DM4.

Hình 9: phân tích HRMS của thể liên hợp chMAb2-SPDB-DM4.

Hình 10: phân tích HRMS của thể liên hợp chMAb4-SPDB-DM4.

Hình 11: phân tích HRMS của thể liên hợp chMAb5-SPDB-DM4.

Hình 12: phân tích HRMS của thể liên hợp huMAb2-2-SPDB-DM4.

Hình 13: phân tích HRMS của thể liên hợp huMAb2-1 -SPDB-DM4.

Hình 14: phân tích HRMS của thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4.

Hình 15: phân tích HRMS của thể liên hợp huMAb2-4-SPDB-DM4.

Hình 16: hoạt động liên kết của các biến thể được nhân hóa (humanised) của MAb2 với miền ngoại bào CEACAM5 ở người và khỉ.

Hình 17: Độ ổn định liên kết của các biến thể được nhân hóa của MAb2 với miền ngoại bào CEACAM5 ở người và khỉ.

Hình 18: Đánh giá hoạt động chống khối u của thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 chống lại ung thư biểu mô tuyến phổi nguyên phát ở người LUN-NIC-0014 ở chuột cái SCID.

Hình 19: Đánh giá hoạt động chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 chống lại ung thư biểu mô tuyến ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở chuột cái trần CD1.

Hình 20: phân tích HRMS của huMAb2-3-sulfoSPDB-DM4.

Hình 21: phân tích HRMS của huMAb2-3-SMCC-DM1.

Hình 22: sự sắp xếp miền biến đổi chuỗi nặng của MAb2, MAb4, MAb5, VH1a được nhân hóa và VH1 được nhân hóa và VHg2 được nhân hóa.

Hình 23: sự sắp xếp miền biến đổi chuỗi nhẹ của MAb2, MAb4, MAb5, VL1 được nhân hóa, VL1a được nhân hóa, VL1c được nhân hóa, VL1d được nhân hóa và VLg5 được nhân hóa.

Mô tả chi tiết sáng chế

"Miền", có thể là bất kỳ vùng nào của protein, thường được xác định trên cơ sở tính tương đồng về trình tự và thường liên quan đến thực thể cấu trúc hoặc chức năng đặc hiệu. Các loại thuộc họ CEACAM được biết là gồm có các miền dạng Ig. Thuật ngữ miền được dùng trong tài liệu này để chỉ hoặc là các miền dạng Ig riêng biệt, chẳng hạn như "miền N" hoặc là cácnhóm của các miền liên tiếp, chẳng hạn như "miền A3-B3".

Tổ chức miền của CEACAM5 ở người là như sau (dựa trên trình tự có số truy cập AAA51967.1 của cơ sở dữ liệu GenBank; SEQ ID NO: 52):

Các miền CEACAM5 ở người	Các vị trí trên SEQ ID NO:52
Miền N	35 - 142
Miền A1	143 - 237
Miền B1	238 - 320
Miền A2	321 - 415
Miền B2	416 - 498
Miền A3	499 - 593
Miền B3	594 - 685

Theo đó, miền A3-B3 của CEACAM5 ở người gồm có các axit amin ở các vị trí 499-685 của SEQ ID NO: 52.

Tổ chức miền của CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* là như sau (dựa trên trình tự miền ngoại bào được sao chép; SEQ ID NO: 53):

Các miền CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*	Các vị trí trên SEQ ID NO:53
Miền N-A1-B1	-1 - 286
Miền A2-B2	-287 - 464
Miền A3-B3	465 - 654

Theo đó, miền A3-B3 của CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* gồm có các axit amin ở các vị trí 465-654 của SEQ ID NO: 53.

"Trình tự mã hóa" hoặc trình tự "mã hóa" sản phẩm biểu hiện, chẳng hạn như ARN, polypeptit, protein, hoặc enzym, là trình tự nucleotit mà, khi được biểu hiện, dẫn đến việc tạo ra ARN, polypeptit, protein, hoặc enzym đó, tức là, trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin cho polypeptit, protein hoặc enzym đó. Trình tự mã hóa cho protein có thể bao gồm codon khởi đầu (thường là ATG) và codon kết thúc.

Như được sử dụng trong tài liệu này, các tham chiếu đến các protein đặc hiệu (ví dụ như các kháng thể) có thể chứa polypeptit có trình tự axit amin tự

nhiên, cũng như các biến thể và các dạng biến đổi bất kể nguồn gốc của chúng hoặc phương thức bào chế chúng. Protein có trình tự axit amin tự nhiên là protein có trình tự axit amin giống như thu được từ tự nhiên. Các protein có trình tự tự nhiên này có thể được phân lập từ tự nhiên hoặc có thể được bào chế bằng các phương pháp tái tổ hợp tiêu chuẩn và/hoặc tổng hợp. Các protein có trình tự tự nhiên đặc hiệu bao gồm các dạng được cắt ngắn hoặc hòa tan có trong tự nhiên, các dạng biến thể có trong tự nhiên (ví dụ như các dạng nối xen kẽ), các biến thể và các dạng alen có trong tự nhiên bao gồm các biến đổi sau dịch mã. Các protein có trình tự tự nhiên bao gồm các protein mang các biến đổi sau dịch mã như glycosyl hóa, hoặc phosphoryl hóa, hoặc các biến đổi khác của một số gốc axit amin.

Thuật ngữ "gen" có nghĩa là trình tự ADN mã hóa cho, hoặc tương ứng với trình tự của các axit amin cụ thể , trình tự AND nàychứa tất cả hoặc một phần của một hoặc nhiều protein hoặc enzym, và có thể chứa hoặc không chứa các trình tự ADN điều chỉnh, chẳng hạn như các trình tự khởi động, các trình tự này xác định các điều kiện theo đó gen được biểu hiện. Một số gen, mà không phải là gen cấu trúc, có thể được phiên mã từ ADN sang ARN, nhưng không được dịch mã thành trình tự axit amin. Các gen khác có thể hoạt động là các gen điều chỉnh của các gen cấu trúc hoặc là các gen điều chỉnh quá trình phiên mã ADN. Đặc biệt, thuật ngữ gen có thể chỉ dành cho trình tự gen mã hóa protein, tức là trình tự bao gồm các trình tự điều chỉnh, khởi động, intron và exon.

Trình tự "tương đồng ít nhất là 85% với trình tự tham chiếu" là trình tự có, trên toàn bộ chiều dài của nó, 85% hoặc lớn hơn, ví dụ như 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tính tương đồng về trình tự với toàn bộ chiều dài của trình tự tham chiếu.

Tỷ lệ phần trăm của "tính tương đồng về trình tự" có thể được xác định bằng cách so sánh hai trình tự, được sắp xếp tối ưu qua cửa sổ so sánh, trong đó phần của trình tự polynucleotit hoặc polypeptit trong cửa sổ so sánh này có thể bao gồm các sự thêm vào hoặc bớt đi (có nghĩa là khoảng trống) khi so sánh với trình tự tham chiếu (trong đó không bao gồm các sự thêm vào hoặc các sự bớt

đi) cho sự sắp xếp tối ưu của hai trình tự này. Tỷ lệ phần trăm này được tính toán bằng cách xác định số các vị trí mà tại đó gốc axit nucleic hoặc gốc axit amin tương đồng xuất hiện ở cả hai trình tự để có được số các vị trí phù hợp, chia số các vị trí phù hợp này cho tổng số các vị trí trong cửa sổ so sánh và nhân kết quả với 100 để có được tỷ lệ phần trăm của tính tương đồng về trình tự. Sự sắp xếp tối ưu của các trình tự để so sánh được thực hiện bởi sự sắp xếp theo cặp chung, ví dụ như bằng cách dùng thuật toán của Needleman và Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Tỷ lệ phần trăm của tính tương đồng về trình tự có thể dễ dàng được xác định, ví dụ như bằng cách dùng các chương trình Needle, với ma trận BLOSUM62, và các thông số sau khoảng trống-mở = 10, khoảng trống-mở rộng = 0,5.

"Sự thế axit amin bảo toàn" là sự thế trong đó gốc axit amin được thế bởi gốc axit amin khác có nhóm R chuỗi bên có các đặc tính hóa học tương tự (ví dụ như, điện tích, kích thước hay tính kỵ nước). Nói chung, sự thế axit amin bảo toàn sẽ không thay đổi đáng kể các đặc tính chức năng của protein. Các ví dụ về các nhóm axit amin có các chuỗi bên có các đặc tính hóa học tương tự gồm có 1) các chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin; 2) các chuỗi bên béo-hydroxyl: serin và threonin; 3) các chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) các chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin và tryptophan; 5) các chuỗi bên bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) các chuỗi bên axit: axit aspartic và axit glutamic; và 7) các chuỗi bên có chứa lưu huỳnh: cystein và methionin. Các nhóm thế các axit amin bảo toàn cũng có thể được xác định trên cơ sở kích thước axit amin.

"Kháng thể" có thể là kháng thể tự nhiên hoặc thông thường, trong đó hai chuỗi nặng được liên kết với nhau bởi các liên kết disulfit và mỗi chuỗi nặng được liên kết với chuỗi nhẹ bằng liên kết disulfit. Có hai loại chuỗi nhẹ, lambda (I) và kappa (k). Có năm loại chuỗi nặng chính (hoặc các đồng vị) quyết định hoạt động chức năng của phân tử kháng thể: IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. Mỗi chuỗi chứa các miền trình tự riêng biệt. Chuỗi nhẹ bao gồm hai miền hoặc vùng, miền biến đổi (VL) và miền cố định (CL). Chuỗi nặng bao gồm bốn miền, miền

biến đổi (VH) và ba miền cố định (CH1, CH2 và CH3, gọi chung là CH). Các vùng biến đổi của cả hai chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nặng (VH) quyết định sự nhận dạng liên kết và tính đặc hiệu với kháng nguyên. Các miền vùng cố định của các chuỗi nhẹ (CL) và chuỗi nặng (CH) mang lại các đặc tính sinh học quan trọng, chẳng hạn như liên kết chuỗi kháng thể, bài tiết, chuyển động qua nhau thai, liên kết bổ sung, và liên kết với các thụ thể Fc (FcR). Đoạn Fv là phần đầu cuối N của đoạn Fab của globulin miễn dịch và gồm có các phần biến đổi của một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng. Tính đặc hiệu của kháng thể là ở sự bổ sung cấu trúc giữa vị trí kết hợp kháng thể và yếu tố quyết định kháng nguyên. Các vị trí kết hợp kháng thể được tạo thành từ các gốc chủ yếu từ các vùng siêu biến hoặc các vùng xác định sự bổ sung (CDR). Đôi khi, các gốc từ các vùng không siêu biến hoặc các vùng khung (FR) ảnh hưởng đến cấu trúc miền tổng thể và vì thế ảnh hưởng đến vị trí kết hợp. Do đó, các vùng xác định sự bổ sung hay các CDR đề cập đến các trình tự axit amin, mà cùng xác định ái lực liên kết và tính đặc hiệu của vùng Fv tự nhiên của vị trí liên kết globulin miễn dịch tự nhiên. Các chuỗi nhẹ và nặng của mỗi globulin miễn dịch có ba CDR, được đặt tên lần lượt là CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L và CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H. Do đó, vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể thông thường, gồm có sáu CDR, bao gồm CDR thiết lập từ mỗi vùng V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ."Các vùng khung" (FR) đề cập đến các trình tự axit amin xen giữa các CDR, tức là các phần của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng của globulin miễn dịch được bảo toàn tương đối giữa các globulin miễn dịch khác nhau ở một loài duy nhất. Các chuỗi nhẹ và nặng của mỗi globulin miễn dịch có bốn FR, được đặt tên lần lượt là FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, và FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Như được sử dụng trong tài liệu này, "vùng khung ở người" là vùng khung về cơ bản có tính tương đồng (khoảng 85%, hoặc nhiều hơn, ví dụ như 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%) với vùng khung của kháng thể ở người trong tự nhiên.

Trong phạm vi của sáng chế, định nghĩa CDR/FR trong chuỗi nhẹ hoặc nặng của globulin miễn dịch được xác định dựa trên định nghĩa IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp.. Immunol, 2003, 27 (1): 55-77; www.imgt.org).

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "kháng thể" có nghĩa là các kháng thể thông thường và các đoạn của chúng, cũng như các kháng thể đơn miền và các đoạn của chúng, đặc biệt là chuỗi nặng biến đổi của các kháng thể đơn miền, và các kháng thể thể khảm, từ người, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu.

Như được sử dụng trong tài liệu này, kháng thể hoặc globulin miễn dịch cũng chứa "các kháng thể đơn miền" đã được được đề cập gần đây và chúng là các kháng thể có các vùng quyết định tính bổ sung là một phần của polypeptit đơn miền. Các ví dụ về các kháng thể đơn miền bao gồm các kháng thể chứa chuỗi nặng, các kháng thể tự nhiên không chứa các chuỗi nhẹ, các kháng thể đơn miền có nguồn gốc từ kháng thể có bốn chuỗi thông thường, các kháng thể đơn miền tổng hợp. Các kháng thể đơn miền có thể có nguồn gốc từ loài bất kỳ trong số các loàinhưng không giới hạn với, chuột, người, lạc đà, lạc đà không bướu, dê, thỏ, bò. Các kháng thể đơn miền có thể là các kháng thể đơn miền xuất hiện trong tự nhiên được gọi là kháng thể chứa chuỗi nặng không chứa các chuỗi nhẹ. Đặc biệt là, loài *Camelidae*, ví dụ như lạc đà, lạc đà một bướu, lạc đà không bướu, alpaca và guanaco, tạo ra các kháng thể chứa chuỗi nặng một cách tự nhiên mà không chứa chuỗi nhẹ. Các kháng thể chứa chuỗi nặng của lạc đà cũng không chứa miền CH1.

Chuỗi nặng biến đổi của các kháng thể đơn miền không chứa các chuỗi nhẹ này được biết đến trong lĩnh vực kĩ thuật nàylà "VHH" hoặc "nanobody". Giống như các miền VH thông thường, VHH chứa bốn FR và ba CDR. Các nanobody có nhiều ưu điểm hơn các kháng thể thông thường: chúng nhỏ hơn so với các phân tử IgG khoảng mười lần, và kết quả là các nanobody chức năng được gấp đúng cách có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện trong ống nghiệm trong khi đạt được năng suất cao. Hơn nữa, các nanobody rất ổn định, và có khả năng chịu tác động của các proteaza. Các đặc tính và quá trình sản xuất các

nanobody đã được xem xét bởi Harmsen và De Haard HJ (Appl. Appl.Microbiol. Biotechnol. Biotechnol. 2007 Nov; 77 (1):13-22).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hay "mAb" như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một phân tử kháng thể của trình tự axit amin đơn lẻ, nhằm chống lại kháng nguyên cụ thể, và không được hiểu là yêu cầu sản xuất kháng thể này bằng bất kỳ phương pháp cụ thể nào. Kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bởi bản sao của các tế bào B đơn lẻ hoặc tế bào lai, nhưng cũng có thể tái tổ hợp, tức là được tạo ra bằng tổng hợp protein.

Thuật ngữ "kháng thể thể khảm" đề cập đến kháng thể được tổng hợp, theo nghĩa rộng nhất của nó, có chứa một hoặc nhiều vùng từ một kháng thể và một hoặc nhiều vùng từ một hoặc nhiều kháng thể khác. Theo một phương án, kháng thể thể khảm chứa miền VH và miền VL của kháng thể có nguồn gốc từ động vật không phải người, liên kết với miền CH và miền CL của kháng thể khác, theo một phương án, là kháng thể của người. Động vật không phải người, là động vật bất kỳ như chuột, chuột (loại gặm nhấm trong giống như chuột), chuột hamster, thỏ hoặc loài tương tự có thể được áp dụng. Kháng thể thể khảm cũng có thể biểu thị kháng thể đa đặc hiệu có tính đặc hiệu đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể từ người" đề cập đến kháng thể mà có nguồn gốc hoàn toàn hay một phần không phải của người và đã được biến đổi để thay thế các axit amin nhất định, ví dụ như trong các vùng khung của các miền VH và VL, để tránh hoặc giảm thiểu phản ứng miễn dịch ở người. Các miền cố định của kháng thể từ người hầu hết thời gian là các miền CH và CL ở người.

"Các đoạn" của các kháng thể (thông thường) chứa một phần của kháng thể nguyên vẹn, đặc biệt là vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn này. Các ví dụ về các đoạn kháng thể gồm có Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, các diabody, các kháng thể đặc hiệu kép và đa đặc hiệu tạo thành từ các đoạn kháng thể. Một đoạn của một kháng thể thông thường cũng có thể là một kháng thể đơn miền, chẳng hạn như kháng thể chuỗi nặng hoặc VHH.

Thuật ngữ "Fab" biểu thị đoạn kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 50000 và có hoạt tính liên kết kháng nguyên, trong đó khoảng một nửa của phía N đầu cuối của chuỗi nặng và toàn bộ chuỗi nhẹ được liên kết với nhau qua liên kết disulfit. Nó thường được lấy trong số các đoạn bằng cách xử lý IgG với proteaza, papain.

Thuật ngữ "F(ab')2" đề cập đến đoạn kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 100000 và có hoạt tính liên kết kháng nguyên, lớn hơn một chút so với 2 đoạn Fab tương đồng liên kết qua liên kết disulfit của vùng bản lề. Nó thường được lấy trong số các đoạn bằng cách xử lý IgG với một proteaza, pepsin.

Thuật ngữ "Fab'" đề cập đến đoạn kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 50000 và hoạt động liên kết kháng nguyên, thu được bằng cách cắt một liên kết disulfit của vùng bản lề của F(ab')2.

Polypeptit Fv chuỗi đơn ("scFv") là dị vòng được liên kết cộng hoá trị VH::VL thường được biểu hiện từ sự dung hợp gen bao gồm các gen mã hóa VH và VL được liên kết bằng liên kết mã hóa peptit. . Đoạn scFv của người theo sáng chế bao gồm các CDR được giữ trong cấu trúc phù hợp, ví dụ bằng cách dùng các kỹ thuật tái tổ hợp gen. Các đoạn kháng thể có hóa trị hai và đa hóa trị có thể hình thành hoặc một cách ngẫu nhiên bằng cách liên kết các scFv có hóa trị một, hoặc có thể được tạo ra bằng cách ghép đôicác scFv có hóa trị một bằng liên kết peptit, như $sc(Fv)_2$ hóa trị hai. "dsFv" là dị vòng VH::VL được ổn định bằng liên kết disulfit. "(dsFv)2" biểu thị hai dsFv được ghép đôi bằng liên kết peptit.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" hoặc "BsAb" biểu thị kháng thể kết hợp các vị trí liên kết kháng nguyên của hai kháng thể trong một phân tử. Như vậy, các BsAb có thể liên kết hai kháng nguyên khác nhau cùng một lúc. Kỹ thuật di truyền đã được sử dụng với tần số ngày càng tăng để thiết kế, sửa đổi, và sản xuất các kháng thể hoặc các dẫn xuất của kháng thể với một tập hợp các đặc tính liên kết mong muốn và các chức năng đáp ứng lại kích thích như được mô tả ví dụ trong EP 2 050 764 A1.

Thuật ngữ "kháng thể đa đặc hiệu" biểu thị kháng thể kết hợp các vị trí liên kết kháng nguyên của hai hay nhiều kháng thể trong một phân tử.

Thuật ngữ "các diabody" đề cập đến các đoạn kháng thể nhỏ với hai vị trí liên kết kháng nguyên, các đoạn này gồm có miền biến đổi chuỗi nặng (VH) kết nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng chuỗi polypeptit (VH-VL). Bằng cách dùng một liên kết là quá ngắn để cho phép ghép đôi giữa hai miền của cùng một chuỗi, các miền này bị buộc phải ghép đôi với các miền bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "tế bào lai" biểu thị một tế bào, mà thu được bằng cách bắt tế bào B được bào chế bằng cách gây miễn dịch cho động vật có vú không phải người với kháng nguyên phải chịu sự hợp nhất tế bào với tế bào u tủy có nguồn gốc từ chuột hoặc loài tương tự tạo ra kháng thể đơn dòng mong muốn có tính đặc hiệu trong kháng nguyên.

Thuật ngữ "được tinh chế" và "được phân lập" có nghĩa là, khi đề cập đến polypeptit (tức là kháng thể của sáng chế) hoặc trình tự nucleotit, thì phân tử được chỉ định có mặt với sự vắng mặt đáng kể của các đại phân tử sinh học khác cùng loại. Thuật ngữ "được tinh chế" như được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa là các đại phân tử sinh học cùng loại có mặt với lượng ít nhất là 75%, 85%, 95%, 96%, 97%, hoặc 98% trọng lượng, . Phân tử axit nucleic "được phân lập" mã hóa polypeptit cụ thể đề cập đến phân tử axit nucleic về cơ bản không có các phân tử axit nucleic khác mà không mã hóa polypeptit chủ thể; tuy nhiên, phân tử này có thể chứa một số bazơ hoặc các gốc khác mà không làm ảnh hưởng xấu đến các đặc tính cơ bản của chế phẩm.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "chủ thể" có nghĩa là động vật có vú, chẳng hạn như loài gặm nhấm, mèo, chó, và loài linh trưởng. Hơn nữa, chủ thể theo sáng chế là con người.

Các kháng thể

Các tác giả sáng chế đã thành công trong việc tạo ra, sàng lọc và lựa chọn các kháng thể kháng CEACAM5 ở chuột và đã cho thấy ái lực cao đối với cả protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*, và các kháng thể này

phản ứng chéo không đáng kể với các protein CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 và CEACAM8 ở người, và với các protein CEACAM1, CEACAM6 và CEACAM8 ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Các tác giả sáng chế đã xác định trình tự của các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của các kháng thể đơn dòng này, còn gọi là các kháng thể MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, và MAb5.

Trình tự được gọi là "kháng thể MAb1" bao gồm:

- miền biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSSYA**MSWVRQTPEKRLEW VAT**ISSGGSYI**YYLDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYY**C ARPAYYGNPAMDY**WG QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 31, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 25, CDR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 26 đến 33 (SEQ ID NO: 1), FR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 34 đến 50, CDR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 51 đến 58 (SEQ ID NO: 2), FR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 59 đến 96, CDR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 97 đến 109 (SEQ ID NO: 3), và FR4-H kéo dài các vị trí axit amin từ 110 đến 120, và

- miền biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự DILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKAS**QNVGTN**VAWYQQKPGQSPKPLI Y**SAS**YRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPLY T**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 26, CDR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 27 đến 32 (SEQ ID NO: 4), FR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 33 đến 49, CDR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 50 đến 52, FR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 53 đến 88, CDR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 89 đến 98 (SEQ ID NO: 6), và FR4-L kéo dài các vị trí axit amin từ 99 đến 108.

Trình tự được gọi là "kháng thể MAb2" bao gồm:

- miền biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS**GFVFSSYD**MSWVRQTPEKRLEWV AY**ISSGGGIT**YFPDTVQGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAIYYC**A**

AHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 33, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 25, CDR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 26 đến 33 (SEQ ID NO: 7), FR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 34 đến 50, CDR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 51 đến 58 (SEQ ID NO: 8), FR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 59 đến 96, CDR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 97 đến 109 (SEQ ID NO: 9), và FR4-H kéo dài các vị trí axit amin từ 110 đến 120, và

- miền biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS**ENIFSY**LAWYQQKQGKSPQLLVY **NTK**TLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC**QHHYGTPFT**F GSGTKLEIK (SEQ ID NO: 34, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 26, CDR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 27 đến 32 (SEQ ID NO: 10), FR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 33 đến 49, CDR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 50 đến 52, FR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 53 đến 88, CDR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 89 đến 97 (SEQ ID NO: 12), và FR4-L kéo dài các vị trí axit amin từ 98 đến 107.

Biến thể của kháng thể MAb2 cũng được tạo ra bằng cách đưa nhóm thế K52R trong CDR2-L. Biến thể này, được gọi là "$Mab2_{K52R}$" trong tài liệu này, về cơ bản có cùng ái lực với CEACAM5 ở người và khỉ *Macaca fascicularis* như MAb2.

Trình tự được gọi là "kháng thể MAb3" bao gồm:

- miền biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự EVKLVESGGGLVKPGGSLTLPCAAS**GFTFSRYA**MSWVRQTPEKRLEWV AS**ISSGGDT**YYPDSVKGRFTVSRDNARNILFLQMSSLRSEDTGMYYC**AR VNYYDSSFLDW**WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 35, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 25, CDR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 26 đến 33 (SEQ ID NO: 13), FR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 34 đến 50, CDR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 51 đến 57 (SEQ ID NO: 14), FR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 58 đến 95,

CDR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 96 đến 108 (SEQ ID NO: 15), và FR4-H kéo dài các vị trí axit amin từ 109 đến 119, và

- miền biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự DIVMTQSQRFMSTLEGDRVSVTCKAS**QNVGTN**VAWYQQKPGQSPKALI YS**AS**YRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNNYPLY T**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 36, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 26, CDR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 27 đến 32 (SEQ ID NO: 16), FR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 33 đến 49, CDR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 50 đến 52, FR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 53 đến 88, CDR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 89 đến 98 (SEQ ID NO: 18), và FR4-L kéo dài các vị trí axit amin từ 99 đến 108.

Trình tự được gọi là "kháng thể MAb4" bao gồm:

- miền biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSSYD**MSWVRQTPEKRLEWV AF**ISSYGGRT**YYADTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMFYC **AAHYFGTSGPFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 37, với các CDR thể hiện trong các ký tự in đậm) trong đó FR1-H kéo dài vị trí axit amin từ 1 đến 25, CDR1-H kéo dài vị trí axit amin từ 26 đến 33 (SEQ ID NO: 19), FR2-H kéo dài vị trí axit amin từ 34 đến 50, CDR2-H kéo dài vị trí axit amin từ 51 đến 58 (SEQ ID NO: 20), FR3-H kéo dài vị trí axit amin từ 59 đến 96, CDR3-H kéo dài vị trí axit amin từ 97 đến 109 (SEQ ID NO: 21), và FR4-H kéo dài vị trí axit amin từ 110 đến 120, và

- miền biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS**ENIYSY**FAWYQQKQGKSPQLLVY **NAK**ILAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYYC**QHHYGIPFT**FG SGTKLELK (SEQ ID NO: 38, với các CDR thể hiện trong các ký tự in đậm) trong đó FR1-L kéo dài vị trí axit amin từ 1 đến 26, CDR1-L kéo dài vị trí axit amin từ 27 đến 32 (SEQ ID NO: 22), FR2-L kéo dài vị trí axit amin từ 33 đến 49, CDR2-L kéo dài vị trí axit amin từ 50 đến 52, FR3-L kéo dài vị trí axit amin

từ 53 đến 88, CDR3-L kéo dài vị trí axit amin từ 89 đến 97 (SEQ ID NO: 24), và FR4-L kéo dài vị trí axit amin từ 98 đến 107.

Trình tự được gọi là "kháng thể MAb5" bao gồm:

- miền biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự ELQLVESGGVLVKPGGSLKLSCAAS**GFAFSSYD**MSWVRQTPEKRLEWV TY**INSGGGIT**YYPDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAIYYC**T AHYFGSSGPFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 39, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 25, CDR1-H kéo dài các vị trí axit amin từ 26 đến 33 (SEQ ID NO: 25), FR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 34 đến 50, CDR2-H kéo dài các vị trí axit amin từ 51 đến 58 (SEQ ID NO: 26), FR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 59 đến 96, CDR3-H kéo dài các vị trí axit amin từ 97 đến 109 (SEQ ID NO: 27), và FR4-H kéo dài các vị trí axit amin từ 110 đến120, và

- miền biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS**ENIYSY**LAWYQQKQGKSPQLLVY **NAK**TLTEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC**QHHYGTPFT**F GSGTKLEIK (SEQ ID NO: 40, với các CDR thể hiện bằng các ký tự in đậm) trong đó FR1 -L kéo dài các vị trí axit amin từ 1 đến 26, CDR1-L kéo dài các vị trí axit amin từ 27 đến 32 (SEQ ID NO: 28), FR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 33 đến 49, CDR2-L kéo dài các vị trí axit amin từ 50 đến 52, FR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 53 đến 88, CDR3-L kéo dài các vị trí axit amin từ 89 đến 97 (SEQ ID NO: 30), và FR4-L kéo dài các vị trí axit amin từ 98 đến 107.

Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với các miền A3-B3 của CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*. Cụ thể hơn là, kháng thể này có thể liên kết với các miền A3-B3 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* một cách không phân biệt dù được thể hiện dưới dạng được phân lập, hoặc có mặt trong miền ngoại bào hòa tan hoặc được neo giữ ở màng tế bào trên toàn bộ chiều dài của protein CEACAM5 .

Tính đặc hiệu của các kháng thể đối với miền A3-B3 của CEACAM5 ở người là lợi thế vì không có SNP nào có tần suất cao hơn 2% trong dân số da trắng đã được báo cáo trong miền này, điều này giảm thiểu rủi ro đó là (các) epitop của các kháng thể trên CEACAM5 bị thay đổi trong một bộ phận dân số này.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* với kháng thể bao gồm các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể được chọn từ nhóm gồm có các kháng thể được gọi là MAb1, MAb2, $MAb2_{K52R}$, MAb3, MAb4, và MAb5, nghĩa là được lựa chọn từ nhóm gồm có:

a) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 31 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của dãy có trình tự SEQ ID NO: 32;

b) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:33 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của dãy có trình tự SEQ ID NO:34;

c) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:33 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của dãy có trình tự SEQ ID NO:34, trong đó K ở vị trí 52 đã được thay thế bởi R;

d) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:35 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của dãy có trình tự SEQ ID NO:36;

e) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:37 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của dãy có trình tự SEQ ID NO:38; và

f) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:39 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của dãy có trình tự SEQ ID NO:40.

Khả năng của kháng thể ứng cử viên cạnh tranh để liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* với kháng thể bao gồm các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể được chọn từ nhóm gồm có các kháng thể MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, và MAb5 (sau đây gọi là kháng thể "tham chiếu") có thể dễ dàng được khảo nghiệm, ví dụ như, bằng kỹ thuật ELISA cạnh tranh trong đó kháng nguyên (có nghĩa là miền A3-B3 của CEACAM5 ở người hoặc ở khỉ *Macaca fascicularis*, hoặc polypeptit

bao gồm hoặc gồm có một đoạn của CEACAM5 ở người hoặc ở khỉ *Macaca fascicularis* gồm cả miền A3-B3 này, đặc biệt là miền ngoại bào của CEACAM5 ở người hoặc ở khỉ *Macaca fascicularis*) được liên kết với chất hỗ trợ rắn và hai dung dịch chứa kháng thể ứng cử viên và kháng thể tham chiếu, lần lượt được thêm vào và các kháng thể này được cho cạnh tranh để liên kết với kháng nguyên. Sau đó, lượng kháng thể tham chiếu liên kết với kháng nguyên có thể được đo lường, và so sánh với lượng kháng thể tham chiếu đã liên kết với các kháng nguyên khi đo với đối chứng âm (ví dụ như dung dịch không chứa kháng thể). Lượng kháng thể tham chiếu đã liên kết với sự có mặt của kháng thể ứng cử viên giảm so với lượng kháng thể tham chiếu đã liên kết với sự có mặt của đối chứng âm cho thấy rằng kháng thể ứng cử viên đã cạnh tranh với kháng thể tham chiếu. Thuận lợi là, kháng thể tham chiếu này có thể được dán nhãn (ví dụ như huỳnh quang) để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện kháng thể tham chiếu đã liên kết. Các phép đo liên tiếp có thể được thực hiện với các sự pha loãng theo thứ tự kháng thể ứng cử viên và/hoặc tham chiếu.

Theo một phương án, kháng thể như vậy, và ví dụ như kháng thể cạnh tranh để liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và khỉ *Macaca fascicularis* với kháng thể như được định nghĩa ở mục b), c), e) và f) ở trên, liên kết với hai vùng của miền A3-B3 của protein CEACAM5 ở người mà gồm có các axit amin ở các vị trí từ 109 đến 115 (SEQ ID NO:76) và các axit amin ở các vị trí từ 131 đến 143 (SEQ ID NO:77) tương ứng của miền A3-B3 của protein CEACAM5 ở người. Thật vậy, epitop cấu trúc cho kháng thể MAb2 đã được xác định thuộc về các vùng từ 109 đến 115 và từ 131 đến 143 của miền A3-B3 của protein CEACAM5 ở người, và MAb2, MAb4 và MAb5 có liên quan chặt chẽ về mặt cấu trúc, các tác giả sáng chế giả định rằng các kháng thể đã đề cập ở trên liên kết với cùng epitop .

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là đặc hiệu đối với bề mặt các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế không liên kết với, hoặc phản ứng chéo không đáng kể với cac protein CEACAM1 ở người, CEACAM6 ở người, CEACAM7 ở

người, CEACAM8 ở người, CEACAM1 ở khỉ *Macaca fascicularis*, CEACAM6 ở khỉ *Macaca fascicularis* và CEACAM8 ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Đặc biệt, kháng thể không liên kết với, hoặc phản ứng chéo không đáng kể với miền ngoại bào của protein CEACAM ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* đã nói trên.

Protein CEACAM1 có chiều dài đầy đủ ở người có sẵn trong cơ sở dữ liệu GenBank theo số truy cập NP_001703.2 (SEQ ID NO:11). Miền ngoại bào của CEACAM1 ở người gồm có các axit amin ở các vị trí từ 35 đến 428 của SEQ ID NO:11. Protein CEACAM6 có chiều dài đầy đủ ở người có sẵn trong cơ sở dữ liệu GenBank theo số truy cập NP_002474.3 (SEQ ID NO:71). Miền ngoại bào của CEACAM6 ở người gồm có các axit amin ở vị trí từ 35 đến 327 của SEQ ID NO:71.

Protein CEACAM7 có chiều dài đầy đủ ở người có sẵn trong cơ sở dữ liệu GenBank theo số truy cập NP_008821.1 (SEQ ID NO:72). Miền ngoại bào của CEACAM7 ở người gồm có các axit amin ở các vị trí 36 đến 248 của SEQ ID NO:72.

Protein CEACAM8 có chiều dài đầy đủ ở người có sẵn trong cơ sở dữ liệu GenBank theo số truy cập NP_001807.2 (SEQ ID NO:73). Miền ngoại bào của CEACAM8 ở người gồm có các axit amin ở các vị trí từ 35 đến 332 của SEQ ID NO:73.

Miền ngoại bào của CEACAM1 ở khỉ *M.fascicularis* gồm có các axit amin ở các vị trí từ 35 đến 428 của protein có chiều dài đầy đủ, tức là các axit amin ở các vị trí từ 1 đến 394 của SEQ ID NO:57.

Miền ngoại bào CEACAM6 ở khỉ *M.fascicularis* gồm có các axit amin ở các vị trí từ 35 đến 327 của protein có chiều dài đầy đủ, tức là các axit amin ở các vị trí từ 1 đến 293 của SEQ ID NO:61.

Miền ngoại bào CEACAM8 ở khỉ *M.fascicularis* gồm có các axit amin ở các vị trí từ 35 đến 332 của protein có chiều dài đầy đủ, tức là các axit amin ở các vị trí từ 1 đến 298 của SEQ ID NO:63.

Về mặt lý thuyết, "ái lực" được định nghĩa là sự kết hợp cân bằng giữa cả kháng thể và kháng nguyên. Nó có thể được đánh giá thực nghiệm bằng một loạt các phương pháp đã biết, chẳng hạn như đo các tỷ lệ kết hợp và phân ly bằng cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc đo EC_{50} (hoặc K_D biểu kiến) trong thử nghiệm hóa miễn dịch (ELISA, FACS). Trong các thử nghiệm này, EC_{50} là nồng độ của kháng thể gây ra phản ứng giữa chừng giữa mức cơ sở và mức tối đa sau một thời gian tiếp xúc cụ thể với nồng độ xác định của kháng nguyên bằng ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym) hoặc tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng FACS (phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang).

Kháng thể đơn dòng liên kết với kháng nguyên 1 (Ag1) là "phản ứng chéo" với kháng nguyên 2 (Ag2) khi các EC_{50} ở trong khoảng tương tự đối với cả hai kháng nguyên. Trong sáng chế này, kháng thể đơn dòng liên kết với Ag1 là phản ứng chéo với Ag2 khi tỷ lệ ái lực của Ag2 với ái lực của Ag1 là nhỏ hơn hoặc bằng 10 (ví dụ như bằng 5, 2, 1 hoặc 0,5), các ái lực được đo bằng phương pháp tương tự đối với cả hai kháng nguyên.

Kháng thể đơn dòng liên kết với Ag1 là "phản ứng chéo không đáng kể" với Ag2 khi các ái lực rất khác nhau đối với hai kháng nguyên. Ái lực đối với Ag2 không thể đo lường được nếu phản ứng liên kết là quá thấp. Trong sáng chế này, kháng thể đơn dòng liên kết với Ag1 là phản ứng chéo không đáng kể với Ag2, khi phản ứng liên kết của kháng thể đơn dòng này với Ag2 là nhỏ hơn 5% phản ứng liên kết của cùng kháng thể đơn dòng với Ag1 trong cùng thiết lập thử nghiệm và ở cùng nồng độ kháng thể. Trong thực tế, nồng độ kháng thể được sử dụng có thể là EC_{50} hoặc nồng độ cần thiết để đạt đến cao nguyên bão hòa thu được với Ag1.

Kháng thể đơn dòng "liên kết đặc hiệu" với, hoặc "là đặc hiệu đối với" Ag1 khi nó không phản ứng chéo đáng kể với Ag2. Theo đó, kháng thể theo sáng chế có tỉ lệ ái lực đối với CEACAM5 ở người với ái lực đối với CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* là ≤ 10, ví dụ như ≤ 5, ≤ 2, ≤ 1, hoặc $\leq 0,5$. Vì vậy, polypeptit theo sáng chế có thể được dùng trong các nghiên cứu về

độc tính được thực hiện ở loài khỉ vì hồ sơ độc tính quan sát thấy ở khỉ sẽ có liên quan đến dự đoán các tác dụng phụ tiềm ẩn lường trước ở con người.

Phương án theo sáng chế có ái lực đối với CEACAM5 ở người hoặc CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*, hoặc cả hai, mà ≤ 10nM, ví dụ như ≤ 5nM, ≤ 3nM, ≤ 1 nM hoặc ≤ 0,1 nM, ví dụ như ái lực nằm trong khoảng từ 0,01 nM đến 5 nM, hoặc và ái lực nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 5 nM, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 1 nM.

Ái lực đối với CEACAM5 ở người hoặc CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* có thể được xác định là giá trị EC50 trong ELISA bằng cách dùng CEACAM5 tái tổ hợp có thể hòa tan làm kháng nguyên bắt.

Kháng nguyên theo sáng chế cũng có thể có một hằng số phân ly biểu kiến (KD biểu kiến), có thể được xác định bằng phân tích FACS trên dòng tế bào khối u MKN45 (DSMZ, ACC 409) hoặc trên các tế bào khối u ghép ngoại lai có nguồn gốc từ bệnh nhân (CR-IGR-034P có sẵn từ Oncodesign Biotechnology, bộ sưu tập khối u CReMEC), mà ≤ 25nM, ví dụ như ≤ 20nM, ≤ 10nM, ≤ 5nm, ≤ 3nM hoặc ≤1 nM. Các KD biểu kiến này có thể nằm trong khoảng từ 0,01 nM đến 20 nM, hoặc có thể nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 20nM, nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 10nM, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 5nM.

Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế đã được chứng minh có thể phát hiện biểu hiện CEACAM5 bằng cách hóa mô miễn dịch các phần mô trong đông lạnh và cố định bằng formalin và được nhúng parafin (FFPE).

Sự sắp xếp các trình tự của các vùng VH và VL của các kháng thể MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5 được thể hiện trong Hình 7. Việc so sánh các trình tự CRD-H và CDR-L chỉ ra rằng, về mặt cấu trúc, một mặt MAb2, MAb4 và MAb5, và mặt khác MAb1 và MAb3, có liên quan chặt chẽ, các kháng thể này có thể liên kết với cùng epitop. Việc so sánh các trình tự CRD-H và CDR-L còn xác định các vị trí CDR được bảo vệ nghiêm ngặt giữa hai nhóm các kháng thể và vì vậy nó được cho là quan trọng đối với tính đặc hiệu, trong khi các vị trí khác có thể hỗ trợ sự thay thế.

Các tác giả sáng chế đã xác định thêm rằng các gốc tại các vị trí từ 101 đến 109 của MAb2 VH (tức là các gốc của CDR3-H) và các gốc tại các vị trí từ 47 đến 54 và từ 88 đến 104 của MAb2 VL (tức là các vùng lần lượt chứa CDR2-L và CDR3- L) tạo ra một phần, hoặc tạo thành, paratop của kháng thể đối với miền A3B3 của CEACAM5 ở người.

Hơn nữa, các gốc tại các vị trí 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, và 97 của MAb2 VL (tức là trong CDR1-L, CDR2-L và CDR3-L), và các gốc tại các vị trí từ 26 đến 31, từ 51 đến 58, 97, 103, 104, 107, và 109 của MAb2 VH (tức là trong CDR1-H, toàn bộ CDR2-H và trong CDR3-H) đã được xác định bằng các sự thay thế axit đơn là trung gian cho liên kết với các miền ngoại bào CECAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus. Ngoài ra, các gốc tại các vị trí 30 và 92 của MAb2 VL (tức là trong CDR1-L và CDR3-L), và các gốc tại các vị trí 98 và 100 của MAb2 VH (tức là trong CDR3-H), đã được chứng minh là chịu sự thay thế bảo toàn. Vì MAb2, MAb4 và MAb5 mang cùng bộ 6 CDR hoặc các CDR có liên quan rất chặt chẽ, nó được coi là các biến thể ở các vị trí tương tự của MAb4 hoặc MAb5 trong VH hay VL hoặc cả hai trình tự VH và CL cũng sẽ dẫn đến các kháng thể biến đổi duy trì liên kết đặc hiệu và/hoặc ái lực đối với CEACAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus.

Đáng lưu ý, tất cả các gốc của CDR2-H được xác định là chất trung gian cho liên kết với miền ngoại bào CEACAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus, các tác giả sáng chế giả định rằng CDR2-H có thể không tham gia vào tương tác này. Theo đó, trong các kháng thể của sáng chế, CDR2-H có thể là bất kỳ trình tự nào có từ 6 đến 10 axit amin, đây là chiều dài cơ bản của các trình tự CDR2-H trong các kháng thể ở người.

Theo đó, kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) CDR1-H gồm có trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO:83) trong đó mỗi X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 và X_6 là axit amin bất kỳ; và

CDR2-H gồm có trình tự dài có từ 6 đến 10 axit amin, tốt hơn là trình tự dài có 8 axit amin trong đó axit amin bất kỳ có thể có mặt ở bất kỳ vị trí nào; và

CDR3-H gồm có trình tự $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO:84) trong đó mỗi X_1, X_4, X_5, X_6, và X_7 là axit amin bất kỳ, X_2 là A hoặc S, và X_3 là Y, F hoặc W; và/hoặc

b) CDR1-L gồm có trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO:85) trong đó mỗi X_1, X_2, X_3 và X_5 là axit amin bất kỳ, và X_4 là Y, F hoặc W; và

CDR2-L gồm có trình tự NX_1X_2 trong đó mỗi X_1 và X_2 là axit amin bất kỳ; và

CDR3-L gồm có trình tự $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$ (SEQ ID NO:86) trong đó mỗi X_1, X_2, X_4, X_5, X_6 và X_7 là axit amin bất kỳ, X_3 là Y, F hoặc W.

Theo một phương án, trong CDR1-H gồm có trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO:83), X_1 là G, hoặc X_2 là F, hoặc X_3 là T, A hoặc V, hoặc X_4 là F, hoặc X_5 là S, hoặc X_6 là S, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án, CDR2-H gồm có trình tự $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO:79) trong đó X_1 là S hoặc N (đặc biệt là S), X_2 là Y hoặc G (đặc biệt là G), X_3 là R hoặc I. Theo một phương án khác, X_3 là I.

Theo một phương án, trong CDR3-H gồm có trình tự$X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO:84), X_1 là A hoặc T, hoặc X_4 là T hoặc S, hoặc X_5 là S, hoặc X_6 là F, hoặc X_7 là Y, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án, trong CDR1-L gồm có trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO:85), X_1 là E, hoặc X_2 là N, hoặc X_3 là I, hoặc X_5 là S, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án, CDR2-L gồm có trình tự NX_1X_2 trong đó X_1 là A hoặc T, và X_2 là K hoặc R.

Theo một phương án, trong CDR3-L gồm có trình tự $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$ (SEQ ID NO:86), X_1 là Q, hoặc X_2 là H, hoặc X_4 là G, hoặc X_5 là T, hoặc X_6 là F, hoặc X_7 là T, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) CDR1-H gồm có trình tự GFX_1FSSYD (SEQ ID NO:78) trong đó X_1 là T, A hoặc V; và

CDR2-H gồm có trình tự $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO:79) trong đó X_1 là S hoặc N (đặc biệt là S), X_2 là Y hoặc G (đặc biệt là G), X_3 là R hoặc I; và

CDR3-H gồm có trình tự $X_1AHYFGX_2SGPFAY$ (SEQ ID NO:80) trong đó X_1 là A hoặc T (đặc biệt là A), và X_2 là T hoặc S; và/hoặc

b) CDR1-L gồm có trình tự ENIFSY (SEQ ID NO:10) hoặc ENIYSY (SEQ ID NO:22); và

CDR2-L gồm có trình tự NX_1X_2 trong đó X_1 là A hoặc T, và X_2 là K hoặc R, đặc biệt là R; CDR2-L gồm có, đặc biệt là NAK, NTK và NTR; và

CDR3-L gồm có trình tự QHHYGTPFT (SEQ ID NO:12) hoặc QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24).

Theo một phương án, trong CDR2-H, X_1 là S hoặc N, X_2 là G và X_3 là I.

Theo một phương án, CDR2-H gồm có ISSGGGIT (SEQ ID NO:8), ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) hoặc INSGGGIT (SEQ ID NO:26).

Theo một phương án, trong CDR3-H, X_1 là A hoặc T, và X_2 là S.

Theo một phương án, CDR3-H gồm có AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), hoặc TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27).

Tổ hợp bất kỳ của các phương án này tạo thành một phần của sáng chế.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) CDR1-H gồm có trình tự $GFTFSX_1YX_2$ (SEQ ID NO:81) trong đó X_1 là R hoặc S, đặc biệt là S, và X_2 là A hoặc D; và

CDR2-H gồm có trình tự $ISSGGX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO:82) trong đó X_1 vắng mặt, S hoặc G (đặc biệt là G), X_2 là D, Y hoặc I, và X_3 là T hoặc I; và

CDR3-H gồm có trình tự ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) hoặc ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); và/hoặc

b) CDR1-L gồm có trình tự QNVGTN (SEQ ID NO:4); và

CDR2-L gồm có trình tự SAS; và

CDR3-L gồm có trình tự QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) hoặc QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18).

Theo một phương án, CDR2-H gồm có trình tự ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) hoặc ISSGGDT (SEQ ID NO:14).

Theo một phương án, CDR2-H gồm có trình tự ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) và CDR3-H của trình tự ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3).

Theo một phương án, CDR2-H gồm có ISSGGDT (SEQ ID NO:14) và CDR3-H của trình tự ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự CDR của các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ của một trong số các kháng thể kháng CEACAM5 được gọi là MAb1, MAb2, $MAb2_{K52R}$, MAb3, MAb4, và MAb5.

Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể bao gồm:

a) CDR1-H của trình tự GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:1 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-H của trình tự ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:2 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR3-H của trình tự ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:3 bởi một nhóm thế axit amin; CDR1-L của trình tự QNVGTN (SEQ ID NO:4) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:4 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-L của trình tự SAS hoặc trình tự khác với SAS bởi một nhóm thế axit amin và CDR3-L của trình tự QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:6 bởi một nhóm thế axit amin; hoặc

b) CDR1-H của trình tự GFVFSSYD (SEQ ID NO:7) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:7 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-H của trình tự ISSGGGIT (SEQ ID NO:8) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:8 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR3-H của trình tự AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:9 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR1-L của trình tự ENIFSY (SEQ ID NO:10) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:10 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-L của trình tự NTK hoặc NTR hoặc trình tự khác với NTK hoặc NTR bởi một nhóm thế axit amin và CDR3-L của trình tự QHHYGTPFT (SEQ ID NO: 12) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:12 bởi một nhóm thế axit amin; hoặc

c) CDR1-H của trình tự GFTFSRYA (SEQ ID NO:13) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:13 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-H của trình tự ISSGGDT (SEQ ID NO:14) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:14 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR3-H của trình tự ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:15 bởi một nhóm thế axit amin; CDR1-L của trình tự QNVGTN (SEQ ID NO:16) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:16 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-L của trình tự SAS hoặc trình tự khác với SAS bởi một nhóm thế axit amin và CDR3-L của trình tự QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:18 bởi một nhóm thế axit amin; hoặc

d) CDR1-H của trình tự GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:19 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-H của trình tự ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:20 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR3-H của trình tự AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:21 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR1-L của trình tự ENIYSY (SEQ ID NO:22) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:22 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-L của trình tự NAK hoặc trình tự khác với NAK bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin và CDR3-L của trình tự QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:24 bởi một nhóm thế axit amin; hoặc

e) kháng thể bao gồm CDR1-H của trình tự GFAFSSYD (SEQ ID NO:25) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:25 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-H của trình tự INSGGGIT (SEQ ID NO:26) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:26 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR3-H của trình tự TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:27 bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin; CDR1-L của trình tự ENIYSY (SEQ ID NO:28) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:28 bởi một nhóm thế axit amin; CDR2-L của trình tự NAK; hoặc trình tự khác với NAK bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin và CDR3-L của trình tự QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:30 bởi một nhóm thế axit amin.

Một hoặc nhiều axit amin đơn lẻ có thể được thay đổi bằng cách thế, đặc biệt là bằng cách thế bảo toàn, trong một hoặc nhiều trình tự CDR ở trên. Sự thay đổi này có thể được dùng, ví dụ như, để loại bỏ vị trí glycosyl hóa hoặc vị trí khử amit, liên quan đến sự nhân bản của kháng thể.

Dựa trên các sự sắp xếp của các trình tự của các vùng VH và VL của MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5, và dựa vào các nhóm thế axit đơn trong biến thể của kháng thể MAb2, axit amin có thể được thế:

- trong CDR1-H: tại một hoặc nhiều vị trí từ 1 đến 6, ví dụ như tại vị trí 3, của CDR1-H của trình tự GFVFSSYD (SEQ ID NO:7), GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) hoặc GFAFSSYD (SEQ ID NO:25), hoặc tại vị trí 6 của CDR1-H của trình tự GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) hoặc GFTFSRYA (SEQ ID NO:13); và/hoặc

- trong CDR2-H, tại một hoặc nhiều vị trí bất kỳ, hoặc tại một, hai hoặc ba vị trí 2, 4, và 7 của CDR2-H của trình tự ISSGGGIT (SEQ ID NO:8), ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) hoặc INSGGGIT (SEQ ID NO:26), hoặc tại một, hai hoặc ba vị trí 6, 7 và 8 (nơi mà trình tự dài 8 axit amin) của CDR2-H của trình tự ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) hoặc ISSGGDT (SEQ ID NO:14); và/hoặc xem ở trên

- trong CDR3-H, tại một hoặc nhiều vị trí 1, 7, 8, 1 1 và 13, ví dụ như tại một hoặc hai vị trí 1 và 7 của CDR3-H của trình tự AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), hoặc TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27), hoặc tại vị trí 3, 4, 7, 8, 9, 10, hoặc 11 của trình tự ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) hoặc ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); và/hoặc

- trong CDR1-L, tại một hoặc nhiều vị trí từ 1 đến 5, đặc biệt là tại một hoặc nhiều vị trí 1, 2, 3 và 5 hoặc tại vị trí 4 của CDR1-L của trình tự ENIFSY (SEQ ID NO:10) hoặc ENIYSY (SEQ ID NO:28); và/hoặc

- trong CDR2-L, tại các vị trí 2 và/hoặc 3 của trình tự NAK, NTK hoặc NTR, đặc biệt là ít nhất tại vị trí 3 nếu K có mặt. Trong trường hợp này, R ví dụ có thể được thế cho K tại vị trí 3 của CDR2-L; và/hoặc

- trong CDR3-L, tại một hoặc nhiều vị trí 1, 2, 5, 6, 8 và 9, ví dụ như tại vị trí 6 của CDR3-L của trình tự QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) hoặc QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30), hoặc tại vị trí 5 của CDR3-L của trình tự QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) hoặc QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18).

Theo một phương án, trong các kháng thể của sáng chế:

- vị trí 5 của CDR3-H của trình tự AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), hoặc TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27); và/hoặc

- vị trí 6 của CDR1-L của trình tự ENIFSY (SEQ ID NO:10) hoặc ENIYSY (SEQ ID NO:28); và/hoặc

- vị trí 3 của CDR3-L của trình tự QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) hoặc QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30)

là chưa bị biến đổi.

Theo một phương án, trong CDR1-H của trình tự GFVFSSYD (SEQ ID NO:7), GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) hoặc GFAFSSYD (SEQ ID NO:25), axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 3 của CDR1-H được chọn từ nhóm gồm có T, A hoặc V.

Theo một phương án, trong CDR1-H của trình tự GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) hoặc GFTFSRYA (SEQ ID NO:13), axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 6 của CDR1-H là R hoặc S.

Theo một phương án, trong CDR3-H của trình tự AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), hoặc TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27), axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 1 của CDR3-H là A hoặc T và/hoặc axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 7 của CDR3-H là T hoặc S.

Theo một phương án, trong CDR3-H của trình tự ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) hoặc ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15), axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 3 của CDR3-H là V hoặc P, tại vị trí 4 là A hoặc N, tại vị trí 7 là D hoặc G, tại vị trí 8 là S hoặc N, tại vị trí 9 là S hoặc P, tại vị trí 10 là F hoặc A, hoặc tại vị trí 11 là W hoặc Y.

Theo một phương án, axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 4 của CDR1-L là Y hoặc F.

Theo một phương án, trong CDR2-L của trình tự NAK, NTK hoặc NTR, axit amin được thế cho axit amin ở vị trí 2 của CDR2-L là A hoặc T.

Theo một phương án, trong CDR3-L của trình tự QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) hoặc QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18), axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 5 của CDR3-L là N hoặc S.

Theo một phương án, trong CDR3-L của trình tự QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) hoặc QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30), axit amin được thế cho axit amin tại vị trí 6 của CDR3-L là I hoặc T.

Tổ hợp bất kỳ của các phương án trên tạo thành một phần của sáng chế.

Trong một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể thông thường, chẳng hạn như kháng thể đơn dòng thông thường, hoặc đoạn kháng thể, kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu.

Trong một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có IgG, hoặc đoạn của nó.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể như được định nghĩa ở trên còn bao gồm ít nhất là miền biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của một trong năm kháng thể kháng CEACAM5 được gọi là MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, và MAb5.

Vì vậy, một phương án của sáng chế đề cập đến kháng thể bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:31 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:32, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

b) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:33, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:34, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

c) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:35, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:36, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

d) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:37, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:38, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

e) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:39, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:40, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó. Ví dụ như, trình tự của miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc nhẹ có thể khác với trình tự tham chiếu SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 hoặc 40, khi thích hợp, bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin, đặc biệt là bởi một hoặc nhiều nhóm thế axit amin bảo toàn và/hoặc (các) nhóm thế có các gốc tiêu chuẩn. Trong một phương án, trình tự của miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc nhẹ có thể khác với trình tự tham chiếu SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 hoặc 40 chỉ bởi (các) nhóm thế axit amin bảo toàn.

Những thay đổi trình tự so với trình tự SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 hoặc 40 về cơ bản sẽ có mặt trong một hoặc nhiều vùng khung, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L và/hoặc FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Tuy nhiên, cũng có thể thế axit amin trong một hoặc nhiều CDR. Trong một phương án, trình tự của miền biến đổi của chuỗi nhẹ có thể khác với trình tự SEQ ID NO:34 ít nhất là bởi sự thế K thành R tại vị trí 52 của SEQ ID NO:34 (trong CDR2-L).

Kháng thể theo sáng chế và đoạn của nó có thể, lần lượt là kháng thể ở chuột và đoạn kháng thể ở chuột.

Kháng thể cũng có thể là kháng thể thể khảm, và trong một phương án là kháng thể ở chuột/người, ví dụ như kháng thể bao gồm các miền biến đổi của

các chuỗi nặng và nhẹ ở chuột và miền CH và miền CL từ kháng thể ở người. Polypeptit có thể là đoạn của kháng thể này.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là:

a) kháng thể thể khảm bao gồm, hoặc gồm có chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:41 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:42 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó (tức là chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của chMAbl như được mô tả trong ví dụ 5); hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc,

b) kháng thể thể khảm bao gồm, hoặc gồm có chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:43 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:44 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; (tức là chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của chMAb2 như được mô tả trong ví dụ 5); hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc,

c) kháng thể thể khảm bao gồm, hoặc gồm có, chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:45 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:46 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; (tức là chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của chMAb3 như được mô tả trong ví dụ 5); hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc,

d) kháng thể thể khảm bao gồm, hoặc gồm có chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:47 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:48 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, (tức là chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của chMAb4 như được mô tả trong ví dụ 5); hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc,

e) kháng thể thể khảm bao gồm, hoặc gồm có chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:49 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:50 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó (tức là chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của chMAb5 như được mô tả trong ví dụ 5), hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc,

f) đoạn của kháng thể thể khảm được định nghĩa trong a), b), c), d) hoặc e).

Kháng thể này cũng có thể là kháng thể được nhân hóa hoặc đoạn của kháng thể được nhân hóa. Theo một phương án, kháng thể của sáng chế có thể có do sự nhân hoá của bất kỳ kháng thể thể khảm nào được định nghĩa trong a), b), c), d), e) hoặc f) nêu trên.

Nhiều phương pháp nhân hóa của trình tự kháng thể được biết trong lĩnh vực kĩ thuật này; ví dụ đánh giá bởi Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633. Một phương pháp thường được dùng là ghép CDR, hoặc định hình lại kháng thể, phương pháp này bao gồm việc ghép các trình tự CDR của kháng thể cho, thường là kháng thể chuột, vào giàn khung của kháng thể của người có tính đặc hiệu khác nhau. Vì việc ghép CDR có thể làm giảm tính đặc hiệu liên kết và ái lực liên kết, và vì vậy hoạt tính sinh học, của kháng thể không phải của người được ghép CDR , các đột biến ngược có thể được đưa vào tại các vị trí đã chọn của kháng thể được ghép CDR để giữ lại tính đặc hiệu liên kết và ái lực liên kết của kháng thể bố mẹ. Việc xác định các vị trí đột biến ngược có thể xảy ra có thể được thực hiện bằng cách dùng các thông tin có sẵn trong tài liệu chuyên ngành và trong các cơ sở dữ liệu kháng thể. Các gốc axit amin làm ứng viên cho các đột biến ngược thường là các gốc nằm ở bề mặt của phân tử kháng thể, trong khi các gốc bị che đi hoặc có mức độ phơi sáng bề mặt thấp thường sẽ không bị biến đổi. Một kỹ thuật nhân hóa khác cho việc ghép CDR và đột biến ngược đang nổi lên, trong đó các gốc không phơi sáng bề mặt có nguồn gốc không phải của người được giữ lại, trong khi các gốc nằm ở bề mặt được biến đổi thành các gốc của người. Một kỹ thuật khác nữa được biết đến là "chọn lọc theo hướng dẫn" (Jespers et al. (1994) Biotechnology 12, 899) và có thể được dùng để lấy được kháng thể hoàn toàn của người từ kháng thể của chuột , trong khi bảo toàn epitop và các đặc tính liên kết của kháng thể bố mẹ.

Đối với các kháng thể thể khảm, việc nhân hóa thường có liên quan đến sự thay đổi của các vùng khung của các trình tự vùng biến đổi.

Các gốc axit amin là một phần của CDR thường sẽ không bị biến đổi vì liên quan đến sự nhân hóa, mặc dù trong một số trường hợp nhất định có thể có mong muốn biến đổi các gốc axit amin CDR riêng lẻ, ví dụ như để loại bỏ vị trí

glycosyl hóa, vị trí khử amit hoặc gốc cystein không mong muốn. Glycosyl hóa liên kết N xảy ra bởi sự gắn kết chuỗi oligosacarit với một gốc asparagin trong trình tự tripeptit Asn-X-Ser hoặc Asn-X-Thr, trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro. Việc loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa có thể đạt được bằng cách làm đột biến hoặc là Asn hoặc là gốc Ser/Thr thành gốc khác, ví dụ bằng cách thế bảo toàn. Sự khử amit của các gốc asparagin và glutamin có thể xảy ra tùy thuộc vào các yếu tố như độ pH và mức độ phơi sáng bề mặt. Các gốc asparagin đặc biệt dễ bị khử amit, chủ yếu khi có mặt trong trình tự Asn-Gly, và ở mức độ thấp hơn trong các trình tự dipeptit khác như Asn-Ala. Khi vị trí khử amit như vậy, ví dụ như Asn-Gly, có mặt trong trình tự CDR, có thể có mong muốn loại bỏ vị trí này, thường là bằng cách thế bảo toàn để loại bỏ một trong các gốc có liên quan. Việc thế trong trình tự CDR để loại bỏ một trong các gốc có liên quan cũng là mục tiêu được sáng chế đề ra.

Lấy kháng thể được gọi là "kháng thể MAb2 " làm ví dụ, kháng thể nhân hóa hoặc đoạn của nó có thể bao gồm các đột biến sau trong chuỗi nặng biến đổi: P thay G ở vị trí 9; và/hoặc G thay V ở vị trí 10; và/hoặc S thay K ở vị trí 19; và/hoặc R thay K ở vị trí 43; và/hoặc G thay R ở vị trí 44; và/hoặc A thay F ở vị trí 60; và/hoặc S thay D ở vị trí 62; và/hoặc K thay Q ở vị trí 65; và/hoặc T thay K ở vị trí 87; và/hoặc V thay I ở vị trí 89; và/hoặc S thay cho A ở vị trí 113; các vị trí này được đưa ra theo tham chiếu đến SEQ ID NO:33.

Vẫn lấy kháng thể được gọi là "kháng thể MAb2" làm ví dụ, kháng thể nhân hóa hoặc đoạn của nó có thể bao gồm các đột biến sau trong chuỗi nhẹ biến đổi: D thay E ở vị trí 17; và/hoặc R thay T ở vị trí 18; và/hoặc P thay Q ở vị trí 40; và/hoặc K thay Q ở vị trí 45; và/hoặc R thay K ở vị trí 52; và/hoặc D thay Q ở vị trí 70; và/hoặc T thay K ở vị trí 74; và/hoặc S thay N ở vị trí 76; và/hoặc A thay G ở vị trí 84; và/hoặc T thay S ở vị trí 85; các vị trí này được đưa ra theo tham chiếu đến SEQ ID NO:34.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể được nhân hóa bao gồm, hoặc gồm có, chuỗi nặng bao gồm các đột biến sau đây, các vị trí được đưa ra theo tham chiếu đến SEQ ID NO:33:

a) P thay G ở vị trí 9; và G thay V ở vị trí 10; và S thay K ở vị trí 19; và R thay K ở vị trí 43; và S thay D ở vị trí 62; và K thay Q ở vị trí 65; và T thay K ở vị trí 87; hoặc

b) P thay G ở vị trí 9; và G thay V ở vị trí 10; và S thay K ở vị trí 19; và R thay K ở vị trí 43; và G thay R ở vị trí 44; và A thay F ở vị trí 60; và S thay D ở vị trí 62; và K thay Q ở vị trí 65; và T thay K ở vị trí 87; và V thay I ở vị trí 89; và S thay A ở vị trí 113; và/hoặc

kháng thể nhân hóa bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến sau đây, các vị trí được đưa ra theo tham chiếu đến SEQ ID NO:34:

c) D thay E ở vị trí 17; và P thay Q ở vị trí 40; và K thay Q ở vị trí 45; và T thay K ở vị trí 74; và S thay N ở vị trí 76; hoặc

d) D thay E ở vị trí 17; và R thay T ở vị trí 18; và P thay Q ở vị trí 40; và K thay Q ở vị trí 45; và D thay Q ở vị trí 70; và T thay K ở vị trí 74; và S thay N ở vị trí 76; và A thay G ở vị trí 84; và T thay S ở vị trí 85; hoặc

e) D thay E ở vị trí 17; và R thay T ở vị trí 18; và P thay Q ở vị trí 40; và K thay Q ở vị trí 45; và R thay K ở vị trí 52; và D thay Q ở vị trí 70; và T thay K ở vị trí 74; và S thay N ở vị trí 76; và A thay G ở vị trí 84; và T thay S ở vị trí 85.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể nhân hóa thu được bằng cách ghép các CDR của một kháng thể theo sáng chế vào các vùng khung của kháng thể khác, cụ thể hơn là vào các vùng khung ở người. Lấy MAb2 làm ví dụ, 6 CDR của $MAb2_{K52R}$ đã được ghép vào khung ở người gồm có các gen IGHV3-23 và IGKV1D-39, và ba đột biến ngược được đưa vào tương ứng với các vị trí 34 và 53 trong VL (SEQ ID NO :34) và vị trí 50 trong VH (SEQ ID NO :33) thu được kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:74 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:75.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể nhân hóa bao gồm, hoặc gồm có, chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:5, hoặc SEQ ID NO:74, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; và/hoặc

chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:55 hoặc SEQ ID NO:75 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó (các miền biến đổi nhân hóa của các chuỗi nặng và nhẹ của MAb2).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể nhân hóa bao gồm chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:51 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:17 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, hoặc chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:5 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:23 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, hoặc chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:5 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:29 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, hoặc chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:51 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:55 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, hoặc chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:74 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:75 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó.

Trong kháng thể nhân hóa hoặc đoạn của nó đã nêu trên, các miền biến đổi của các chuỗi nặng và nhẹ có thể bao gồm các vùng khung thụ thể ở người. Kháng thể nhân hóa này còn bao gồm cả các miền chuỗi nặng và nhẹ cố định của người, nếu có.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể huMAb2-3 hoặc biến thể của nó, tức là kháng thể được phân lập liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* và kháng thể này bao gồm:

a) chuỗi nặng gồm có trình tự SEQ ID NO:87 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

b) chuỗi nhẹ gồm có trình tự SEQ ID NO:88 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể huMAb2-4 (MAb2_VL1d VH1-IgG1) hoặc biến thể của nó, tức là kháng thể được phân lập liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* và kháng thể này bao gồm:

c) chuỗi nặng gồm có trình tự SEQ ID NO:89 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; và/hoặc

d) chuỗi nhẹ gồm có trình tự SEQ ID NO:90 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể là kháng thể đơn miền hoặc đoạn của nó. Theo một phương án của sáng chế, đoạn kháng thể đơn miền có thể gồm có chuỗi nặng biến đổi (VHH) bao gồm CDR1-H, CDR2-H và CDR3-H của các kháng thể như được mô tả ở trên. Kháng thể này cũng có thể là kháng thể chuỗi nặng, tức là kháng thể không có chuỗi nhẹ, kháng thể này có thể chứa hoặc không chứa miền CH1.

Kháng thể đơn miền hoặc đoạn của nó cũng có thể bao gồm các vùng khung của một kháng thể đơn miền của lạc đà, và tùy ý miền cố định của kháng thể đơn miền của lạc đà.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể là đoạn kháng thể, ví dụ như đoạn kháng thể nhân hóa, được chọn từ nhóm gồm có FV, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(FV)2, và các diabody.

Kháng thể này cũng có thể là kháng thể có đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu tạo thành từ các đoạn kháng thể, ít nhất một đoạn kháng thể là đoạn kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể đa đặc hiệu là các phức hợp protein đa hóa trị như được mô tả ví dụ trong EP 2 050 764 A1 hoặc US 2005/0003403 A1.

Các kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu theo sáng chế có thể có tính đặc hiệu đối với (a) epitop A3-B3 của CEACAM5 ở người/ở khỉ *Macaca fascicularis* là mục tiêu của một trong số các số kháng thể được gọi là MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5 và (b) ít nhất một kháng nguyên khác. Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên khác không phải là thành viên thuộc họ CEACAM ở người hoặc ở khỉ *Macaca fascicularis*, và theo một phương án,

không ít nhất một hoặc toàn bộ CEACAM1 ở người và khỉ *Macaca fascicularis*, CEACAM6 ở người và ở khỉ, CEACAM7 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*, và CEACAM8 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*. Theo phương án khác, ít nhất một kháng nguyên khác có thể là epitop của CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* khác với epitop A3-B3 là mục tiêu của một trong số các kháng thể được gọi là MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5 đã nêu trên.

Các kháng thể đã nêu trên có thể được sản xuất bằng bất kỳ kỹ thuật nào được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kĩ thuật này. Theo một phương án, các kháng thể đã nêu trên được sản xuất bằng các kỹ thuật như được mô tả sau đây. Các kháng thể và các đoạn của chúng theo sáng chế có thể được dùng ở dạng được phân lập (ví dụ như tinh chất) hoặc được chứa trong vật truyền, như màng hoặc túi lipit (ví dụ như hạt mỡ).

Các xxit nucleic, các vật truyền và các tế bào chủ tái tổ hợp

Mục đích khác của sáng chế là đề cập tới trình tự axit nucleic bao gồm hoặc gồm có trình tự mã hóa kháng thể theo sáng chế như được định nghĩa ở trên.

Thông thường, axit nucleic đã nêu trên là phân tử ADN hoặc ARN, axit nucleic này có thể được đưa vào trong bất kỳ vật truyền thích hợp nào, chẳng hạn như plasmit, cosmid, episom, nhiễm sắc thể nhân tạo, thể thực khuẩn hoặc vật truyền virut.

Các thuật ngữ "vật truyền", "vật truyền tách dòng" và "vật truyền biểu hiện" có nghĩa là vật mang mà nhờ nó trình tự ADN hoặc ARN (ví dụ như gen ngoại lai) có thể được đưa vào tế bào chủ, để chuyển hóa vật chủ và xúc tiến việc biểu hiện (ví dụ như phiên mã và dịch mã) của trình tự được đưa vào.

Vì vậy, mục đích khác của sáng chế là đề cập đến vật truyền bao gồm axit nucleic theo sáng chế.

Các vật truyền này có thể bao gồm các yếu tố điều chỉnh, chẳng hạn như chất xúc tiến, chất tăng cường, chất kết thúc và tương tự, yêu cầu hoặc điều khiển việc biểu hiện của polypeptit đã nêu khi dùng cho một đối tượng. Các ví

dụ về các chất xúc tiến và các chất tăng cường được dùng trong vật truyền biểu hiện cho tế bào động vật gồm chất xúc tiến và chất tăng cường sớm của SV40 (Mizukami T. et al. 1987), chất xúc tiến và chất tăng cường LTR của virut bệnh bạch cầu ở chuột Moloney (Kuwana Y et al. 1987), chất xúc tiến (Mason JO et al. 1985) và chất tăng cường (Gillies SD et al. 1983) của chuỗi H globulin miễn dịch và tương tự.

Bất kỳ vật truyền biểu hiện nào cho tế bào động vật cũng có thể được dùng, miễn là gen mã hóa kháng thể vùng C ở người có thể được chèn thêm vào và biểu hiện. Các ví dụ về các vật truyền thích hợp gồm pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4- (Miyaji H et al. 1990) và tương tự.

Các ví dụ khác về các plasmit gồm các plasmit sao chép bao gồm nguồn gốc của sao chép, hoặc các plasmit tích hợp, ví dụ như pUC, pcADN, pBR, và tương tự.

Các ví dụ khác về vật truyền virut bao gồm các vật truyền adenovirut, retrovirut, virut herpes và AAV. Các virut tái tổ hợp này có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật được biết đến trong lĩnh vực kĩ thuật này, chẳng hạn như bằng chuyển nhiễm đóng gói tế bào hoặc chuyển nhiễm thoáng qua với các plasmit hoặc virut helper. Các ví dụ điển hình về các tế bào đóng gói virut gồm các tế bào PA317, các tế bào PsiCRIP, các tế bào GPenv+, các tế bào 293, v.v. Giao thức chi tiết cho việc sản xuất các virut tái tổ hợp sao chép bị lỗi như vậy có thể được tìm thấy ví dụ trong WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 và WO 94/19478.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến một tế bào đã được chuyển nhiễm, được nhiễm bệnh hoặc được biến đổi bởi axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế.

Thuật ngữ "biến đổi" có nghĩa là việc đưa một gen bên ngoài (tức là ngoại lai), trình tự ADN hoặc ARN vào tế bào chủ, vì vậy mà tế bào vật chủ sẽ biểu hiện gen hoặc trình tự được đưa vào để tạo ra một chất mong muốn, điển hình là

protein hoặc enzym được mã hóa bởi gen hoặc trình tự được đưa vào. Tế bào chủ tiếp nhận và biểu hiện ADN hoặc ARN được đưa vào đã bị "biến đổi".

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được dùng để sản xuất kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế trong hệ thống biểu hiện thích hợp. Thuật ngữ "hệ thống biểu hiện" có nghĩa là tế bào chủ và vật truyền tương thích trong điều kiện thích hợp, ví dụ như cho sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi ADN ngoại lai được thực hiện bởi vật truyền và được đưa vào tế bào chủ.

Các hệ thống biểu hiện thường gồm các tế bào chủ *E. coli* và các vật truyền plasmit, các tế bào chủ của côn trùng và các vật truyền Baculovirut, và các tế bào chủ và các vật truyền của động vật có vú. Các ví dụ khác về các tế bào chủ bao gồm, nhưng không giới hạn, các tế bào nhân sơ prokaryotic (như vi khuẩn) và các tế bào nhân chuẩn eukaryotic (chẳng hạn như các tế bào nấm men, các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng, các tế bào thực vật, v.v.). Các ví dụ cụ thể bao gồm các dòng tế bào *E. coli*, nấm men *Kluyveromyces* hoặc *Saccharomyces*, động vật có vú (ví dụ như các tế bào Vero, các tế bào CHO, các tế bào 3T3, các tế bào COS, v.v.) cũng như nuôi cấy tế bào động vật có vú gốc hoặc đã thiết lập (ví dụ như được tạo ra từ các nguyên bào lympho, các nguyên bào sợi, các tế bào phôi thai, các tế bào biểu mô, các tế bào thần kinh, các tế bào mỡ, v.v.). Các ví dụ cũng bao gồm tế bào SP2/0-Ag14 của chuột (ATCC CRL1581), tế bào P3X63-Ag8.653 của chuột (ATCC CRL1580), tế bào CHO trong đó gen reductaza dihydrofolat (sau đây gọi là "gen DHFR") bị khiếm khuyết (Urlaub G et al, 1980), tế bào YB2/3HL.P2.G1 1.16Ag.20 ở chuột (ATCC CRL1662, sau đây gọi là "tế bào ΄YB2/0"), và tương tự. Theo một phương án, tế bạo YB2/0 được dùng, vì hoạt tính ADCC của kháng thể thể khảm hoặc kháng thể nhân hóa được tăng cường khi biểu hiện trong tế bào này.

Đối với biểu hiện của kháng thể nhân hóa, vật truyền biểu hiện có thể hoặc là của loại mà trong đó gen mã hóa chuỗi nặng của kháng thể và gen mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể tồn tại trên các vật truyền riêng biệt hoặc là của loại mà trong đó cả hai gen tồn tại trên cùng vật truyền (loại song song). Đối với việc dễ dàng tạo ra vật truyền biểu hiện kháng thể nhân hoá, dễ dàng đưa vào

trong các tế bào động vật, và cân bằng giữa các mức độ biểu hiện của các chuỗi H và L của kháng thể trong các tế bào động vật, các vật truyền biểu hiện của kháng thể nhân hoá là loại song song của Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 Jan. 3; 167(1-2):271-8). Các ví dụ về loại vật truyền biểu hiện của kháng thể nhân hoá song song gồm có pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 và tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào chủ tái tổ hợp biểu hiện kháng thể theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước: (i) đưa axit nucleic hoặc vật truyền tái tổ hợp *in vitro* hoặc *ex vivo* như được mô tả ở trên vào tế bào chủ khả nạp, (ii) nuôi cấy *in vitro* hoặc *ex vivo* tế bào chủ tái tổ hợp thu được và (iii), tùy ý, chọn các tế bào biểu hiện và/hoặc tiết ra kháng thể đã nêu.

Các tế bào chủ tái tổ hợp này có thể được dùng để sản xuất các kháng thể theo sáng chế.

Các phương pháp sản xuất các kháng thể theo sáng chế

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng bất kỳ kỹ thuật nào đã biết trong lĩnh vực kĩ thuật này, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn, kỹ thuật hóa học, sinh học, di truyền hoặc enzym, riêng rẽ hoặc kết hợp.

Biết được trình tự axit amin của trình tự mong muốn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kĩ thuật này có thể dễ dàng tạo ra các kháng thể hoặc các chuỗi globulin miễn dịch đã nêu, bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn để tạo ra các polypeptit. Ví dụ, chúng có thể được tổng hợp bằng phương pháp pha rắn được biến đến rộng rãi bằng cách dùng thiết bị tổng hợp peptit có sẵn trên thị trường (như thiết bị được sản xuất bởi Applied Biosystems, Foster City, California) và làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngoài ra, các kháng thể và các chuỗi globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp như được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kĩ thuật này. Ví dụ, các đoạn này có thể thu được với tư cách là các sản phẩm biểu hiện ADN sau khi kết hợp các trình tự ADN mã hóa (poly)peptit mong muốn vào các vật truyền biểu hiện và đưa các vật truyền đó vào các vật chủ có nhân (eukaryotic) điển hình

hoặc không nhân (nhân sơ prokaryotic) phù hợp sẽ biểu hiện polypeptit mong muốn này, từ đó chúng có thể được cô lập sau bằng cách dùng các kỹ thuật được biết đến rộng rãi.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước là: (i) nuôi cấy tế bào chủ biến đổi theo sáng chế; (ii) biểu hiện kháng thể hoặc polypeptit đã nêu; và (iii) phục hồi kháng thể hoặc polypeptit được biểu hiện này.

Các kháng thể theo sáng chế được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy một cách thích hợp bằng các phương pháp thanh lọc globulin miễn dịch thông thường, ví dụ như protein A-Sepharose, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, sắc ký ái lực.

Theo một phương án, kháng thể thể khảm được nhân hóa theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách lấy các trình tự nucleic mã hóa các miền VL và VH được nhân hóa như được mô tả trên đây, bào chế vật truyền biểu hiện kháng thể thể khảm ở người bằng cách chèn chúng vào vật truyền biểu hiện cho tế bào động vật có các gen mã hóa CH và CL của kháng thể ở người, và biểu hiện trình tự mã hóa này bằng cách đưa các vật truyền biểu hiện vào tế bào động vật.

Miền CH của kháng thể thể khảm ở người, có thể là bất kỳ vùng nào thuộc các chuỗi nặng globulin miễn dịch ở người, nhưng các chuỗi đó thuộc lớp IgG là phù hợp và một phân lớp bất kỳ trong các phân lớp thuộc lớp IgG, như IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, cũng có thể được dùng. Ngoài ra, CL của kháng thể thể khảm ở người, có thể là bất kỳ vùng nào thuộc các chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người, và các chuỗi đó thuộc lớp kappa hoặc lớp lambda có thể được dùng.

Các phương pháp sản xuất các kháng thể được nhân hóa hoặc thể khảm bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và chuyển nhiễm gen thông thường được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kĩ thuật này (xem Morrison SL et al. (1984) và các văn bằng sáng chế US 5.202.238; và US 5.204.244).

Các phương pháp sản xuất các kháng thể được nhân hóa dựa trên các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và chuyển nhiễm gen thông thường được biết đến rộng rãi

trong lĩnh vực kĩ thuật này (xem, ví dụ, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985). Các kháng thể có thể được nhân hóa bằng cách dùng các kỹ thuật được biết đến trong lĩnh vực kĩ thuật này gồm có, ví dụ như kỹ thuật được bộc lộ trong đơn WO2009/032.661, ghép CDR (EP 239.400; công bố PCT WO91/09.967; các sáng chế Hoa Kỳ số 5.225.539; 5.530.101; và 5.585.089), veneering hoặc tái tạo bề mặt (EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), và xáo trộn chuỗi (sáng chế Hoa Kỳ số 5.565.332). Công nghệ tái tổ hợp ADN chung để việc bào chế các kháng thể này cũng được biết đến (xem đơn Sáng chế châu Âu EP 125023 và đơn sáng chế quốc tế WO 96/02576).

Fab theo sáng chế có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể phản ứng đặc hiệu với CEACAM5 bằng proteaza, như papain. Ngoài ra, Fab có thể được tạo ra bằng cách chèn các trình tự ADN mã hóa cả hai chuỗi của Fab của kháng thể vào vật truyền để biểu hiện nhân sơ (prokaryotic), hoặc để biểu hiện nhân chuẩn (eukaryotic), và đưa vật truyền này vào các tế bào prokaryotic hoặc eukaryotic (cho phù hợp) để biểu hiện Fab.

F(ab')2 theo sáng chế có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể phản ứng đặc hiệu với CEACAM5 bằng proteaza, pepsin. Ngoài ra, F(ab')2 có thể được tạo ra bằng cách liên kết Fab' được mô tả dưới đây thông qua liên kết thioete hoặc liên kết disulfit.

Fab' theo sáng chế có thể thu được bằng cách xử lý F(ab')2 mà phản ứng đặc hiệu với CEACAM5 bằng chất khử, như dithiothreitol. Ngoài ra, các Fab' có thể được tạo ra bằng cách chèn các trình tự ADN mã hóa các chuỗi Fab' của kháng thể vào vật truyền để biểu hiện nhân sơ (prokaryotic), hoặc vật truyền để biểu hiện nhân chuẩn (eukaryotic), và đưa vật truyền này vào các tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn (cho phù hợp) để thực hiện sự biểu hiện của nó.

scFv theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách dùng các trình tự của các CDR hoặc các miền VH và VL như được mô tả trên đây, bào chế ADN mã hóa đoạn scFv, chèn ADN này vào vật truyền biểu hiện nhân sơ hoặc nhân chuẩn, và sau đó đưa vật truyền biểu hiện này vào các tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn

(cho phù hợp) để biểu hiện scFv. Để tạo ra đoạn scFv được nhân hóa, kỹ thuật được biết đến rộng rãi được gọi là ghép CDR có thể được sử dụng, kỹ thuật này bao gồm việc lựa chọn các vùng quyết định tính bổ sung (CDR) theo sáng chế, và ghép chúng vào vùng khung của đoạn scFv có cấu trúc ba chiều đã biết ở người (ví dụ, xem WO98/45.322; WO 87/02671; US 5.859.205; US 5.585.089; US 4.816.567; EP 0173494).

Sự biến đổi của các kháng thể theo sáng chế

Sự biến đổi trình tự axit amin của các kháng thể được mô tả trong tài liệu này đã được dự tính. Ví dụ, nó có thể được mong muốn để cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Được biết, khi kháng thể được nhân hóa được tạo ra bằng cách đơn giản chỉ ghép các CDR trong VH và VL của kháng thể bắt nguồn từ động vật không phải người trong các FR của VH và VL của kháng thể ở người, hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể bị giảm so với hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu bắt nguồn từ động vật không phải người. Được cho rằng một vài gốc axit amin của VH và VL của kháng thể không phải ở người, không chỉ ở các CDR mà còn trong các FR, có thể liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến các hoạt tính liên kết kháng nguyên. Do đó, sự thế các gốc axit amin này bằng các gốc axit amin khác có nguồn gốc từ các FR của VH và VL của kháng thể ở người sẽ làm giảm hoạt tính liên kết. Để giải quyết vấn đề này, trong các kháng thể ở người được ghép với các CDR không phải ở người, những nỗ lực đã được thực hiện để nhận dạng, trong số các trình tự axit amin của FR của VH và VL của các kháng thể ở người, gốc axit amin có liên quan trực tiếp đến liên kết của kháng thể này, hoặc gốc axit amin tương tác với gốc axit amin của CDR, hoặc gốc axit amin duy trì cấu trúc ba chiều của kháng thể và có liên quan trực tiếp đến liên kết với kháng nguyên. Hoạt tính liên kết kháng nguyên giảm có thể được làm tăng lên bằng cách thay thế các axit amin được nhận dạng bằng các gốc axit amin của kháng thể ban đầu có nguồn gốc từ động vật không phải người.

Theo một phương án của sáng chế, sáu CDR của kháng thể ở chuột theo sáng chế và ba axit amin từ khung của chúng được ghép vào khung của người,

thu được kháng thể được nhân hóa (MAb2_VLg5VHg2) có chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:74 và chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:75, kháng thể được nhân hoá này duy trì các đặc tính liên kết với CEACAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus.

Các sự biến đổi và thay đổi có thể được thực hiện trong cấu trúc của các kháng thể theo sáng chế, và trong các trình tự ADN mã hóa chúng, và vẫn thu được kháng thể hoặc polypeptit chức năng với các đặc tính mong muốn.

Khi đưa ra những thay đổi trong các trình tự amin của polypeptit, chỉ số thuộc về thủy liệu pháp của các axit amin có thể được xem xét. Tầm quan trọng của chỉ số axit amin thủy liệu pháp trong việc tạo ra chức năng sinh học tương tác trên protein thường được biết trong lĩnh vực kĩ thuật này. Được thừa nhận rằng đặc tính thuộc về thủy liệu pháp tương đối của axit amin góp phần vào cấu trúc thứ cấp của protein thu được, mà lần lượt xác định sự tương tác của protein với các phân tử khác, ví dụ như các enzym, các chất nền, các thụ thể, ADN, các kháng thể, các kháng nguyên, và các phân tử tương tự. Mỗi axit amin đã được gán một chỉ số thuộc về thủy liệu pháp trên cơ sở các đặc tính kỵ nước và tích điện của chúng, đó là: axit amin thiết yếu (+4,5); valin (+4,2); leuxin (+3,8); phenylalanin (+2,8); cystein/cystin (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glyxin (-0,4); threonin (-0,7); serin (-0,8); Tryptophan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamat (-3,5); glutamin (-3,5); aspartat (-3,5); asparagin (5); lysin (-3,9); và arginin (-4,5).

Mục đích khác của sáng chế cũng bao gồm các biến thể bảo toàn chức năng của các polypeptit theo sáng chế.

Ví dụ, các axit amin nhất định có thể được thế bằng các axit amin khác có cấu trúc protein mà giảm không đáng kể hoạt tính . Vì khả năng tương tác và tính chất của protein xác định hoạt tính chức năng sinh học của nó, các sự thế axit amin nhất định có thể được thực hiện trong trình tự protein, và dĩ nhiên trong trình tự mã hóa ADN của nó, trong khi vẫn thu được protein có các đặc tính tương tự. Do vậy, dự tính rằng những thay đổi khác nhau có thể được thực hiện trong các trình tự của các kháng thể theo sáng chế, hoặc các trình tự ADN

tương ứng mà mã hóa các polypeptit nói trên, mà giảm không đáng kể hoạt tính sinh học của chúng.

Được biết đến trong lĩnh vực kĩ thuật này rằng các axit amin nhất định có thể được thế bằng các axit amin khác có chỉ số hoặc điểm số thủy liệu pháp tương tự và vẫn thu được protein với hoạt tính sinh học tương tự, tức là vẫn có được protein tương đương về chức năng sinh học. Cũng có thể sử dụng các công nghệ đã được thiết lập tốt, chẳng hạn như các phương pháp quét alanin, để nhận dạng, trong kháng thể hoặc polypeptit theo sáng chế, tất cả các axit amin có thể bị thế mà giảm không đáng kể liên kết với kháng nguyên. Các gốc này có thể được coi là trung tính, vì chúng không tham gia vào liên kết kháng nguyên hay duy trì cấu trúc của kháng thể. Một hoặc nhiều vị trí trung gian tính có thể được thế bằng alanin hoặc bằng axit amin khác mà không làm thay đổi các đặc tính chính của kháng thể hoặc polypeptit theo sáng chế.

Điều này đã được minh họa trong sáng chế bằng phương pháp quét alanin được thực hiện trên các CDR của $MAb2_{K52R}$, cho thấy rằng một vài vị trí của các CDR này xuất hiện là trung tính, vì alanin thực sự có thể được thế mà không làm ảnh hưởng đáng kể đến liên kết với CEACAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus. Do đó, các biến thể của kháng thể do các sự thế trung tính này được cho rằng vẫn giữ nguyên tính tương đồng về mặt chức năng với kháng thể gốc. Trong ví dụ 6.4 được đưa ra, các sự thế đã được thực hiện trong biến thể được nhân hóa của MAb2, nhưng nó có thể dự đoán rằng các biến thể tương tự cũng sẽ duy trì chức năng sinh học khi đưa vào bất kỳ biến thể nào của MAb2, Mab4 hoặc Mab5, vì các kháng thể có liên quan này đều mang cùng một bộ 6 CDR hoặc là những kháng thể có liên quan rất chặt chẽ. Các vị trí trung tính có thể được định nghĩa là các gốc 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 trong các trình tự VL của họ kháng thể này (SEQ ID NO:34 hoặc SEQ ID NO:38 hoặc SEQ ID NO:40 hoặc SEQ ID NO:17 hoặc SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:29 hoặc SEQ ID NO:55 hoặc SEQ ID NO:75) và các gốc từ 26 đến 31, từ 51 đến 58, 97, 103, 104, 107, 109 trong các trình tự VH của họ kháng thể này (SEQ ID NO:33

hoặc SEQ ID NO:37 hoặc SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:51 hoặc SEQ ID NO:74).

Các vị trí trung tính có thể được xem như là các vị trí mà bất kỳ sự thế axit amin nào cũng có thể được kết hợp với các CDR của Mab2, Mab4 hoặc Mab5. Thật vậy, trong nguyên lý quét alanin, alanin được chọn vì là gốc không mang các đặc tính về mặt cấu trúc đặc trưng hoặc về mặt hóa học. Nó thường được thừa nhận rằng nếu anlanin có thể được thế cho axit amin đặc hiệu mà không làm thay đổi các tính chất của protein, thì nhiều chất khác, nếu không tất cả sự thế axit amin có khả năng cũng là trung tính. Trong trường hợp ngược lại, khi alanin là axit amin dạng tự nhiên, nếu sự thế đặc trưng có thể được chứng minh là trung tính, thì có khả năng là các sự thế khác cũng sẽ là trung tính.

Trong ví dụ 6.4 được đưa ra, bốn vị trí trong các CDR của Mab2, Mab4 hoặc Mab5 cũng được nhận dạng, các vị trí này không được thấy là trung tính trong phạm vi nguyên lý quét alanin, nhưng ở đódạng bảo toàn của các sự thế axit amin có hiệu ứng trung tính (các gốc 30 và 92 trong các trình tự VL và các gốc 98 và 100 trong các trình tự VH của họ kháng thể này).

Cũng được mong đợi rằng hai hoặc nhiều đột biến trung tính tại các vị trí khác nhau trong bất kỳ hoặc cả hai trình tự của chuỗi kháng thể, khi kết hợp, thường sẽ thu được kháng thể mà chủ yếu giữ các hoạt tính chức năng của kháng thể bố mẹ. Điều này đã được minh họa ví dụ với các nhóm thế kết hợp LC_T51A và LC_T94A, VL_S31A và VH_G54Y, hay VL _T53I và VH _S53A trong MAb2_VLg5VHg2.

Như đã nêu ở trên, do đó, các sự thế axit amin thường được dựa trên tính tương đồng tương đối của các nhóm thế ở chuỗi bên axit amin, ví dụ, tính kỵ nước, tính ưa nước, điện tích, kích thước của chúng, và các đặc tính tương tự. Các sự thế điển hình có xem xét đến đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính nào đã đề cập ở trên được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ và bao gồm: arginin và lysin; glutamat và aspartat; serin và threonin; glutamin và asparagin; và valin, leuxin và axit thiết yếu.

Cũng có thể có mong muốn biến đổi kháng thể theo sáng chế về chức năng phản ứng lại kích thích, ví dụ như để tăng cường độc tính tế bào trung gian phụ thuộc kháng nguyên (ADCC) và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) của kháng thể. Điều này có thể đạt được bằng cách đưa một hoặc nhiều sự thế axit amin vào trong vùng Fc của kháng thể. Ngoài ra hoặc thêm vào đó, (các) gốc cystein có thể được đưa vào trong vùng Fc, do đó cho phép hình thành liên kết disulfit liên chuỗi trong vùng này. Do đó, kháng thể cùng đối xứng hai bên được tạo ra có thể cải thiện khả năng tiếp nhận và/hoặc làm tăng tiêu diệt tế bào trung gian bổ thể và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Caron PC et al. 1992; và Shopes B. 1992).

Kiểu biến đổi axit amin khác của kháng thể theo sáng chế có thể hữu ích để thay đổi dạng glycosyl hóa ban đầu của kháng thể, tức là bằng cách bỏ đi một hoặc nhiều gốc cacbohydrat được tìm thấy trong kháng thể, và/hoặc thêm vào một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa không có mặt trong kháng thể. Sự có mặt của một trong hai trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X threonin, trong đó X là bất kỳ axit amin nào ngoại trừ prolin, tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Việc thêm hoặc bỏ đi các vị trí glycosyl hóa với kháng thể được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách thay đổi các trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả ở trên (đối với các vị trí glycosyl hóa liên kết N).

Kiểu biến đổi khác liên quan đến việc loại bỏ các trình tự được xác định, trong mô phỏng hoặc bằng thực nghiệm, có khả năng dẫn đến sự phân hủy các sản phẩm hoặc tính không đồng nhất của các chế phẩm kháng thể. Ví dụ, quá trình khử amit của các gốc asparagin và glutamin có thể xảy ra tùy thuộc vào các yếu tố như độ pH và mức độ phơi sáng bề mặt. Các gốc asparagin đặc biệt dễ bị khử amit, chủ yếu khi xuất hiện trong trình tự Asn-Gly, và ở mức độ thấp hơn trong các trình tự dipeptit khác như Asn-Ala. Khi ở vị trí khử amit này, đặc biệt là Asn-Gly, có trong kháng thể hoặc polypeptit theo sáng chế, do đó, có thể mong muốn loại bỏ vị trí này, thường bằng cách thế bảo toàn để loại bỏ một

trong các gốc có liên quan. Các sự thế trong trình tự này để loại bỏ một hoặc nhiều gốc có liên quan cũng được đề xuất bởi sáng chế.

Kiểu biến đổi cộng hóa trị khác liên quan đến việc ghép cặp các glycosit về mặt hóa học hoặc enzym với kháng thể. Các quy trình này có ưu điểm là chúng không yêu cầu tạo ra kháng thể trong tế bào chủ có khả năng glycosyl hóa để glycosyl hóa liên kết N hoặc O. Tùy thuộc vào kiểu ghép cặp được sử dụng, (các) đường có thể được gắn với (a) arginin và histidin, (b) các nhóm cacboxyl tự do, (c) các nhóm sulfhydryl tự do như của cystein, (d) các nhóm hydroxyl tự do như của serine, threonin, orhydroxyprolin, (e) cac gốc thơm chẳng hạn như của phenylalanin, tyrosin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Ví dụ, các phương pháp này được mô tả trong WO87/05330.

Việc loại bỏ bất kỳ gốc cacbohydrat nào có trên kháng thể có thể được thực hiện về mặt hóa học hoặc enzym. Quá trình khử gycosyl hóa bằng hóa học yêu cầu kháng thể tiếp xúc với hợp chất axit triflometansulfonic, hoặc hợp chất tương đương. Việc xử lý này dẫn đến việc phân cắt hầu hết hoặc toàn bộ các đường ngoại trừ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin), trong khi vẫn giữ nguyên kháng thể. Quá trình khử gycosyl hóa bằng hóa học được mô tả bởi Sojahr H. et al. (1987) và Edge, AS. et al. (1981). Có thể đạt được sự phân cắt enzym của các gốc cacbohydrat trên các kháng thể bằng cách sử dụng nhiều endo- và exo-glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura, NR. et al. (1987).

Kiểu biến đổi cộng hóa trị khác của kháng thể bao gồm cho kháng thể liên kết với một trong nhiều polyme không chứa protein, ví dụ như polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc các polyoxyalkylen, theo cách được quy định trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 hoặc 4.179.337.

Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế cũng bao gồm các thể liên hợp gây độc tế bào, hoặcthể liên hợp miễn dịch, hoặc thể liên hợp kháng thể-thuốc, hoặc thể liên hợp. Như được dùng

trong tài liệu này, tất cả các thuật ngữ này có cùng nghĩa và có thể thay thế cho nhau.

Các kháng thể ở chuột, MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, và MAb5, đã được liên hợp với maytansinoit (DM4) thông qua liên kết SPDB (N-suxinimidyl pyridyl dithiobutyrat). Các liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) thu được được phát hiện có hoạt tính gây độc tế bào trên các tế bào ung thư dạ dày ở người MKN45, với các giá trị $IC_{50} \leq 1$ nM.

Tương tự, các liên hợp kháng thể-SPDB-DM4 được điều chế dựa trên dạng thể khảm của mỗi MAb1, MAb2, MAb4 và MAb5. chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb3-SPDB-DM4 và chMAb4-SPDB DM4 thu được được đánh giá ở hai liều lượng chống lại các khối u CR-IGR-034P ruột kết nguyên phát có thể đo được được cấy ghép s.c. ở chuột cái SCID. Phân tích những thay đổi về thể tích khối u cho mỗi lần điều trị và kiểm soát và tỷ lệ % hồi quy khối u chỉ ra rằng chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4 và chMAb5-SPDB-DM4 có hoạt tính cao, ít nhất là ở liều cao nhất được thử nghiệm, và chMAb2-SPDB-DM4 có hoạt tính ở cả hai liều được thử nghiệm. Đáng chú ý là đã thu được các tỷ lệ phần trăm hồi quy khối u lên đến 82%.

Các liên hợp kháng thể-SPDB-DM4 cũng được điều chế bằng cách sử dụng các biến thể được nhân hóa của MAb2 (huMAb2-1-SPDB DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4 và huMAb2-3-SPDB-DM4). ADC bao gồm các biến thể (chMAb2-SPDB-DM4) thể khảm hoặc được nhân hóa của MAb2 được so sánh với kháng thể-SPDB-DM4 không liên quan về hoạt tính gây độc tế bào trên các tế bào MKN45. Tất cả các biến thể của MAb2 ADC dạng khảm và được nhân hóa hiển thị các giá trị $IC_{50} \leq 1$ nM, tức là giá trị IC_{50} thấp hơn từ 53 đến 35 lần so với hoạt tính gây độc tế bào đo được của thể liên hợp DM4 không liên quan, do đó cho thấy các hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian CEACAM5 của các thể liên hợp kháng CEACAM5.

Hoạt tính chống khối u của huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-4-SPDB-DM4 đã được đánh giá và so sánh với chMAb2-SPDB-DM4 chống lại các khối u CR-IGR-034P ruột kết nguyên phát có thể đo được được cấy ghép

s.c. ở những con chuột cái trụi lông CD-1. Tất cả các thể liên hợp đều có hoạt tính cao ở liều lượng cao nhất được thử nghiệm (10 mg/kg).

Hoạt tính chống khối u của huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 còn được đánh giá chống lại các khối u CR-IGR-034P ruột kết nguyên phát có thể đo được được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái SCID. huMAb2-3-SPDB-DM4 có hoạt tính ở liều lượng 5 và 2,5 mg/kg, huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 có hoạt tính cao ở liều lượng 5 mg/kg và hoạt tính ở liều lượng 2,5 mg/kg.

Hoạt tính chống khối u của huMAb2-3-SPDB-DM4 còn được đánh giá chống lại các khối u LUN-NIC0014 phổi nguyên phát có thể đo được được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái SCID và được phát hiện là có hoạt tính cao ở liều lượng 10 và 5 mg/kg.

Mỗi thể liên hợp DM4 bao gồm số các phân tử DM4 trung bình (hoặc "tỷ lệ thuốc trên kháng thể" hoặc "DAR") nằm trong khoảng từ 2 đến 5.

Theo đó, sáng chế đề cập đến "thể liên hợp miễn dịch" bao gồm kháng thể theo sáng chế được liên kết hoặc liên hợp với ít nhất một chất ức chế tăng trưởng, chẳng hạn như tác nhân gây độc tế bào hoặc đồng vị phóng xạ.

"Chất ức chế tăng trưởng", hoặc "chất chống tăng sinh", có thể được sử dụng theo cách không phân biệt, dùng để chỉ hợp chất hoặc chế phẩm ức chế sự phát triển của tế bào, đặc biệt là tế bào khối u, hoặc *in vitro* hoặc *in vivo*.

Thuật ngữ "tác nhân gây độc tế bào" như được dùng trong tài liệu này đề cập đến chất ức chế hoặc ngăn chặn chức năng của các tế bào và/hoặc gây ra sự phá hủy của các tế bào. Thuật ngữ "tác nhân gây độc tế bào" được dùng bao gồm các tác nhân trị liệu hóa học, các enzym, các kháng sinh và các chất độc như các chất độc phân tử nhỏ hoặc các chất độc hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc biến thể của chúng, và các chất chống khối u hoặc chống ung thư khác nhau được bộc lộ dưới đây. Theo một số phương án, tác nhân gây độc tế bào là một đơn vị phân loại, vincas, maytansinoit hoặc chất tương tự maytansinoit như DM1 hoặc DM4, loại thuốc nhỏ, tomaymyxin hoặc dẫn xuất pyrolobenzodiazepin, dẫn xuất

cryptophyxin, dẫn xuất leptomyxin, auristatin hoặc chất tương tự dolastatin, tiền dược chất, các chất ức chế topoisomeraza II, chất alkyl hóa ADN, chất chống tubulin, CC-1065 hoặc chất tương tự CC-1065.

Như được sử dụng trong tài liệu này "các maytansinoit" biểu thị các maytansinoit và các chất tương tự maytansinoit. Các maytansinoit là các thuốc ức chế sự hình thành vi ống và có độc tính cao đối với các tế bào động vật có vú.

Các ví dụ về các maytansinoit thích hợp bao gồm maytansinol và các chất tương tự maytansinol.

Các ví dụ về các chất tương tự maytansinol thích hợp bao gồm những chất có vòng thơm được biến đổi và những chất có các sự biến đổi ở các vị trí khác. Các maytansinoit thích hợp này được bộc lộ trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; và 5.846.545.

Các ví dụ cụ thể về các chất tương tự maytansisol thích hợp có vòng thơm được biến đổi gồm:

(1) C-19-declo (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,256,746) (điều chế bằng cách khử LAH của ansamytoxin P2);

(2) C-20-hydroxy (hoặc C-20-demetyl) +/- C-19-declo (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,361,650 và 4,307,016) (được điều chế bằng cách khử metyl sử dụng *Streptomyces* hoặc *Actinomyces* hoặc khử clo bằng LAH); và

(3) C-20-demetoxy, C-20-axyloxy (-OCOR), +/- declo (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,294,757) (được điều chế bằng cách axyl hóa sử dụng axyl clorua).

Các ví dụ cụ thể về các chất tương tự maytansinol thích hợp có các sự biến đổi của các vị trí khác gồm:

(1) C-9-SH (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,424,219) (được điều chế bằng phản ứng của maytansinol với H_2S hoặc P_2S_5);

(2) C-14-alkoxymetyl (demetoxy/CH_2OR) (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,331,598);

(3) C-14-hydroxymetyl hoặc axyloxymetyl (CH_2OH hoặc CH_2OAc) (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,450,254) (được điều chế từ *Nocardia*);

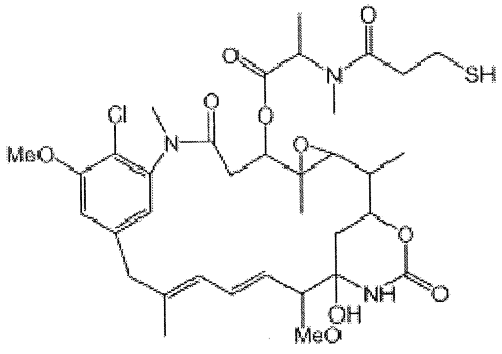
(4) C-15-hydroxy/axyloxy (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,364,866) (được điều chế bằng cách chuyển hóa maytansinol bởi *Streptomyces*);

(5) C-15-metoxy (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,313,946 và 4,315,929) (được phân lập từ *Trewia nudiflora*);

(6) C-18-*N*-demetyl (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,362,663 và 4,322,348) (được điều chế bằng cách khử metyl của maytansinol bởi *Streptomyces*); và

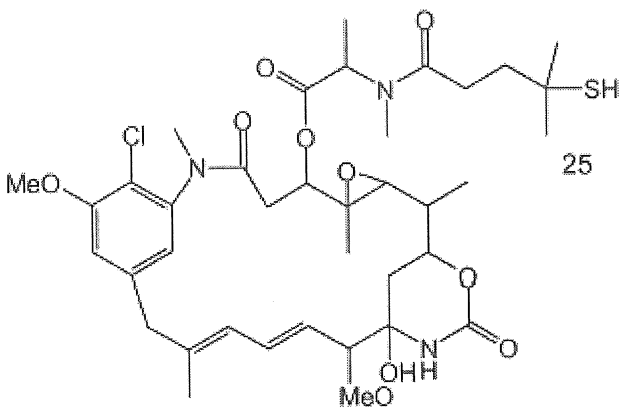
(7) 4,5-deoxy (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,371,533) (được điều chế bằng cách khử titan triclorua/LAH của maytansinol).

Theo một phương án của sáng chế, các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế sử dụng maytansinoit (DM1) chứa thiol, chính thức được gọi là $N^{2'}$-deaxetyl-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin, làm tác nhân gây độc tế bào. DM1 được thể hiện bằng công thức cấu tạo sau (I):



(I).

Theo phương án khác, các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế sử dụng maytansinoit DM4 có chứa thiol, chính thức được gọi là $N^{2'}$-deaxetyl-N-$^{2'}$(4-metyl-4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansin, làm tác nhân gây độc tế bào. DM4 được thể hiện bằng công thức cấu tạo sau (II):



(II)

Theo các phương án khác của sáng chế, có thể sử dụng các maytansin khác, bao gồm cả maytansinoid chứa thiol và disulfua mang nhóm thế mono hoặc di-alkyl trên nguyên tử cacbon mang nguyên tử lưu huỳnh. Chúng bao gồm maytansinoit có, ở C-3, C-14 hydroxymetyl, C-15 hydroxy, hoặc C-20 desmetyl, chuỗi bên axit amin được axyl hóa với nhóm axyl mang nhóm sulfhydryl bị cản trở, trong đó nguyên tử cacbon của nhóm axyl mang chức năng thiol có một hoặc hai nhóm thế, các nhóm thế này là CH_3, C_2H_5, alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 10 thuốc thử và bất kỳ tổ hợp nào có thể có mặt trong dung dịch.

Ngoài ra, các ví dụ về các tác nhân gây độc tế bào và các phương pháp liên hợp được cung cấp trong đơn WO2008/010101.

Thuật ngữ "đồng vị phóng xạ" nhằm bao gồm các đồng vị phóng xạ thích hợp để điều trị ung thư, chẳng hạn như At^{211}, Bi^{212}, Er^{169}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, In^{111}, P^{32}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Sr^{89} và các đồng vị phóng xạ của Lu. Các đồng vị phóng xạ này thường chủ yếu phát ra bức xạ beta. Theo một phương án, đồng vị phóng xạ là đồng vị phát ra bức xạ alpha, chính xác hơn là Thorium 227 phát ra bức xạ alpha. Các thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được điều chế như được mô tả trong đơn WO2004/091668.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được gắn cộng hóa trị, trực tiếp hoặc thông qua mối liên kết có thể phân cắt hoặc không phân cắt được, với ít nhất một chất ức chế tăng trưởng.

"Mối liên kết", được sử dụng trong tài liệu này, có nghĩa là gốc hóa học bao gồm liên kết cộng hóa trị hoặc chuỗi các nguyên tử liên kết cộng hóa trị polypeptit với với gốc thuốc.

Các thể liên hợp có thể được điều chế bằng các phương pháp *in vitro*. Để liên kết thuốc hoặc tiền dược chất với kháng thể, nhóm liên kết được sử dụng. Các nhóm liên kết thích hợp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kĩ thuật này và bao gồm các nhóm disulfua, các nhóm thioete, các nhóm axit không bền, các nhóm không bền với ánh sáng, các nhóm peptidaza không bền và các nhóm esteraza không bền. Việc liên hợp kháng thể theo sáng chế với các tác nhân gây độc tế bào hoặc các tác nhân ức chế tăng trưởng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều tác nhân ghép nối protein hai chức năng khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn với N-suxinimidyl pyridyldithiobutyrat (SPDB), axit butanoic 4-[(5-nitro-2-pyridinyl)dithio]-2,5-dioxo-1-pyrolidinyl este (nitro-SPDB), axit 4-(Pyridin-2-yldisulfanyl)-2-sulfo-butyric (sulfo-SPDB), N-suxinimidyl (2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl (N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức năng của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), các este hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis-(p-azidobenzoyl)-hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl metyldietylen triaminpentaaxetic (MX-DTPA) được đánh dấu cacbon là tác nhân chelat hoá điển hình để liên hợp radionucleotit với kháng thể (WO 94/11026).

Mốiliên kết có thể là "liên kết có thể phân tách" tạo điều kiện giải phóng tác nhân gây độc tế bào hoặc tác nhân ức chế tăng trưởng trong tế bào. Ví dụ như có thể sử dụng liên kết axit không bền, liên kết nhạy cảm với peptidaza, liên kết esteraza không bền, liên kết không bền với ánh sáng hoặc liên kết chứa disulfua (Xem ví dụ: Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5.208.020). Mối liên kết cũng có

thể là "liên kết không thể phân tách" (ví dụ như liên kết SMCC) có thể dẫn đến khả năng chịu đựng tốt hơn trong một số trường hợp.

Ngoài ra, protein dung hợp bao gồm kháng thể theo sáng chế và polypeptit gây độc tế bào hoặc ức chế tăng trưởng có thể được tạo ra, bằng các kỹ thuật tái tổ hợp hoặc tổng hợp peptit. Chiều dài của ADN có thể bao gồm các vùng tương ứng mã hóa hai phần của thể liên hợp hoặc liền kề nhau hoặc được ngăn cách bởi một vùng mã hóa peptit liên kết mà không phá hủy các đặc tính mong muốn của thể liên hợp.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được dùng trong liệu pháp điều trị bằng tiền dược chất trung gian phụ thuộc enzym bằng cách liên hợp polypeptit với enzym hoạt hóa tiền dược chất biến đổi tiền dược chất (ví dụ như tác nhân trị liệu hóa học peptidyl, xem WO81/01 145) thành thuốc có hoạt tính chống ung thư (Xem, ví dụ, WO 88/07378 và Bằng sáng chế Mỹ số 4.975.278). Thành phần enzym của thể liên hợp miễn dịch hữu ích cho ADEPT bao gồm bất kỳ enzym nào có khả năng hoạt động trên tiền dược chất theo cách để biến đổi nó thành dạng có hoạt tính hơn, gây độc tế bào của nó. Các enzym rất hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn với, phosphataza kiềm hữu ích cho việc biến đổi các tiền dược chất chứa phosphat thành các thuốc độc lập; arylsulfataza hữu ích cho việc biến đổi các tiền dược chất chứa sulfat thành các thuốc độc lập; cytosin deaminaza hữu ích cho việc biến đổi flocytosin không độc hại thành thuốc chống ung thư, 5-floroaxil; các proteaza, như Serratia proteaza, thermolysin, subtilisin, các các cacboxypeptidaza và các cathepsin (như các cathepsin B và L) mà có ích cho việc biến đổi các các tiền dược chất chứa peptit thành các thuốc độc lập; các D-alanylcacboxypeptidaza, có ích cho việc biến đổi các tiền dược chất chứa các nhóm thế D-axit amin; các enzym cacbohydrat phân giải như O-galactosidaza và neuraminidaza hữu ích cho việc biến đổi các tiền dược chất được glycosyl hoá thành các thuốc độc lập; P-lactamaza hữu ích cho việc biến đổi các thuốc dẫn xuất với các P-lactam thành các thuốc độc lập; và các amidaza penixilin, như penixilin V amidaza hoặc penixilin G amidaza, hữu ích cho việc biến đổi các

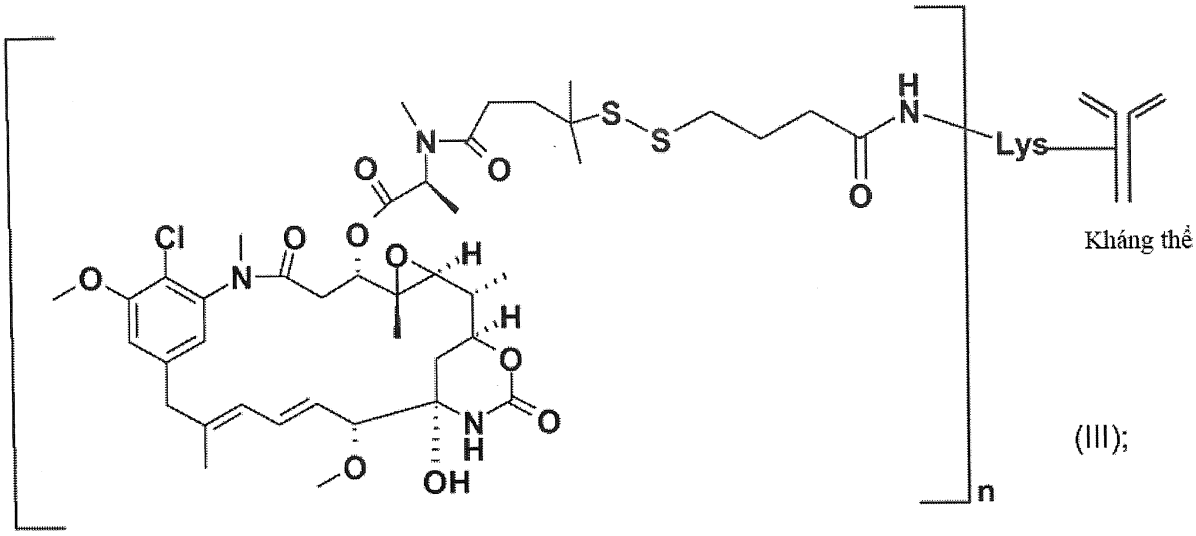
thuốc dẫn xuất tại các nitơ amin của chúng với các nhóm phenoxyaxetyl hoặc phenylaxetyl, tương ứng, thành thuốc độc lập. Các enzym có thể được liên kết cộng hóa trị với các polypeptit theo sáng chế bằng các kỹ thuật được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kĩ thuật này chẳng hạn như việc dùng các chất phản ứng liên kết chéo có hai chức khác nhau đã được đề cập ở trên.

Theo một phương án, trong thể liên hợp theo sáng chế, tác nhân ức chế tăng trưởng là maytansinoit, theo một phương án là DM1 hoặc DM4.

Trong thể liên hợp nêu trên, kháng thể được liên hợp với ít nhất một tác nhân ức chế tăng trưởng nêu trên bằng nhóm liên kết. Theo một phương án, nhóm liên kết nêu trên là mối liên kết có thể phân tách hoặc không thể phân tách, như SPDB, sulfo-SPDB, hoặc SMCC.

Thể liên hợp có thể được lựa chọn từ nhóm gồm có:

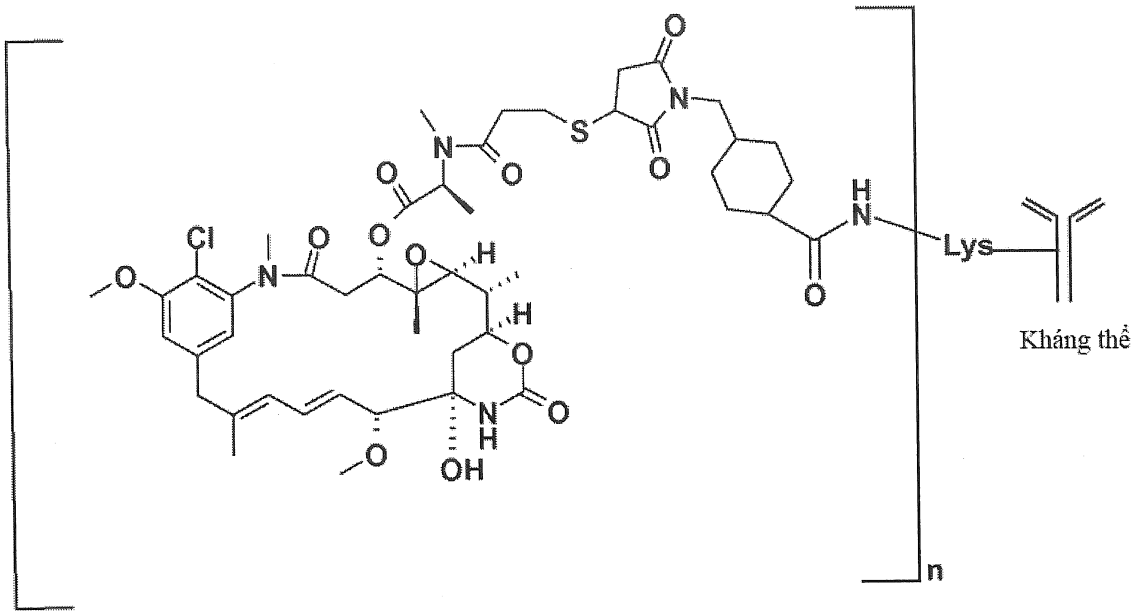
i) thể liên hợp kháng thể-SPDB-DM4 có công thức (III)



(III);

Ab-SPDB-DM4

ii) thể liên hợp kháng thể-sulfo-SPDB-DM4 có công thức (IV)

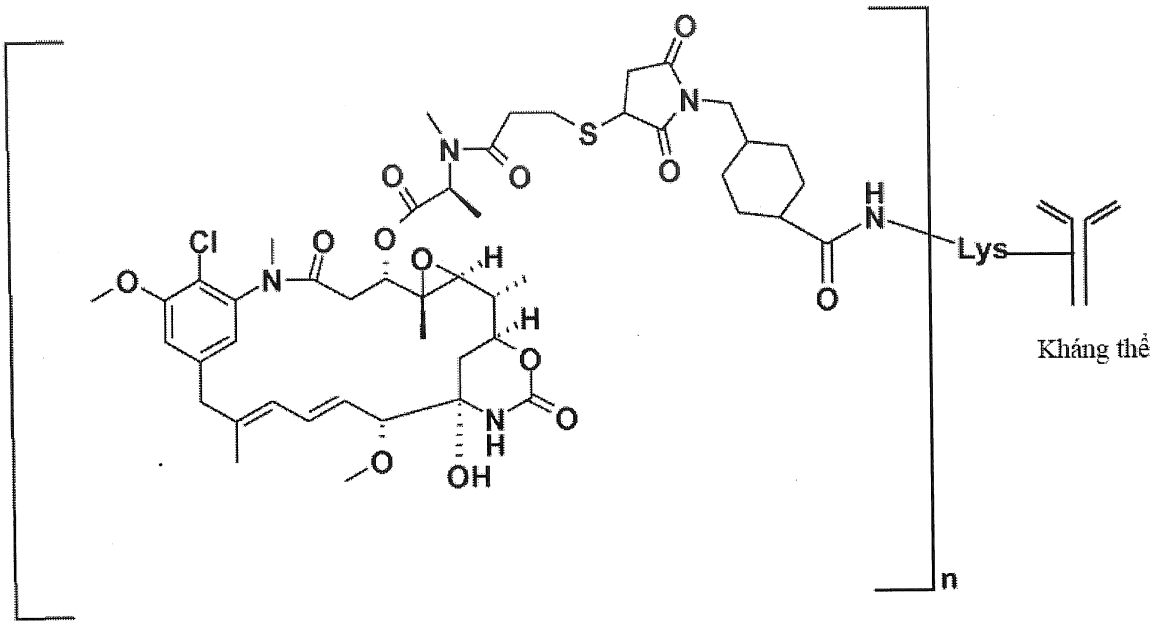


(V).

Ab-SMCC-DM1

và

iii) thể liên hợp kháng thể-SMCC-DM1 có công thức (V)



(V).

Ab-SMCC-DM1

Theo phương án đã nêu, kháng thể được bao gồm trong thể liên hợp được chọn từ nhóm gồm có:

i) kháng thể được nhân hoá bao gồm mạch nặng của trình tự SEQ ID NO:51 và mạch nhẹ của trình tự SEQ ID NO:17,

ii) kháng thể được nhân hoá bao gồm mạch nặng của trình tự SEQ ID NO:5 và mạch nhẹ của trình tự SEQ ID NO:23,

iii) kháng thể được nhân hoá bao gồm mạch nặng của trình tự SEQ ID NO:5 và mạch nhẹ của trình tự SEQ ID NO:29, và

iv) kháng thể được nhân hoá bao gồm mạch nặng của trình tự SEQ ID NO:51 và mạch nhẹ của trình tự SEQ ID NO:55.

Theo một phương án, thể liên hợp là liên hợp có công thức (III), (IV) hoặc (V) như được định nghĩa ở trên, trong đó kháng thể là kháng thể được nhân hoá bao gồm mạch nặng của trình tự SEQ ID NO:5 và mạch nhẹ của trình tự SEQ ID NO:29.

Nhìn chung, thể liên hợp này có thể thu được bằng quá trình bao gồm các bước:

(i) cho dung dịch nước đệm tuỳ ý của một tác nhân liên kết tế bào (ví dụ như kháng thể theo sáng chế) với các các dung dịch của mối liên kết và hợp chất gây độc tế bào;

(ii) sau đó tách tuỳ ý thể liên hợp được tạo thành trong bước (i) từ tác nhân liên kết tế bào không phản ứng.

Dung dịch nước của tác nhân liên kết tế bào có thể được đệm với các chất đệm như kali phosphat, axetat, xitrat hoặc axit N-2-Hydroxyetylpiperazin-N'-2-etansulfonic (chất đệm Hepes). Chất đệm này tuỳ thuộc tính chất của tác nhân liên kết tế bào. Hợp chất gây độc tế bào trong dung dịch trong dung môi hữu cơ phân cực, ví dụ như dimetyl sulfoxit (DMSO) hoặc dimetylaxetamit (DMA).

Nhiệt độ phản ứng thường nằm giữa 20 và 40°C. Thời gian phản ứng có thể thay đổi từ 1 đến 24 giờ. Phản ứng giữa tác nhân liên kết tế bào và tác nhân gây độc tế bào có thể được điều chỉnh bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC) với đầu dò khúc xạ và/hoặc UV. Nếu năng suất của thể liên hợp quá thấp, thời gian phản ứng có thể được kéo dài.

Một số phương pháp sắc ký khác có thể được sử dụng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kĩ thuật này để thực hiện việc tách của bước (ii): thể liên hợp có thể được làm sạch, ví dụ như bằng phương pháp SEC, sắc ký hấp thụ (chẳng hạn như sắc ký trao đổi ion, IEC), sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), sắc ký ái lực, sắc ký hỗ trợ hỗn hợp như sắc ký hydroxyapatit, hoặc sắc kí lỏng hiệu năng cao

(HPLC). Việc làm sạch bằng phương pháp thẩm tách hoặc lọc tách cũng có thể được sử dụng.

Như được dùng trong tài liệu này, thuật ngữ "tổng hợp" có nghĩa là các sự kết hợp có thể được tạo thành giữa hai hay nhiều tác nhân liên kết tế bào, các tác nhân đã nêu bị biến đổi hoặc không bởi sự liên hợp. Tổng hợp này có thể được tạo thành dưới ảnh hưởng của một số lượng lớn các thông số, chẳng hạn như nồng độ cao của tác nhân liên kết tế bào trong dung dịch, độ PH của dung dịch, lực cắt cao, số các chất nhị trùng được liên kết và đặc tính kỵ nước của chúng, nhiệt độ (xem Wang & Gosh, 2008, J. Membrane Sci., 318: 311-316, và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó); lưu ý rằng ảnh hưởng tương đối của một số các thông số chưa được xác định rõ. Trong trường hợp của các protein và các kháng thể, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đề cập đến Cromwll et al. (2006, AAPS Jounal, 8(3): E572-E579). Hàm lượng trong tổng hợp có thể được xác định với các kỹ thuật được biết đến rộng rãi bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, như SEC (xem Walter et al., 1993, Anal. Biochem., 212(2): 469-480).

Sau bước (i) hoặc (ii), dung dịch chứa thể liên hợp có thể được trải qua thêm một bước (iii) sắc ký, siêu lọc và/hoặc lọc tách.

Thể liên hợp được thu hồi lại ở phần cuối của các bước này trong dung dịch nước.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế được

đặc trưng bởi một "tỷ lệ thuốc với kháng thể" (hoặc "DAR") nằm trong khoảng từ 1 đến 10, chẳng hạn nằm trong khoảng từ 2 đến 5, cụ thể là nằm trong khoảng từ 3 đến 4. Đây thường là trường hợp các thể liên hợp chứa các phân tử maystansinoit.

Số DAR này có thể thay đổi tùy thuộc tính chất của kháng thể và thuốc (tức là tác nhân ức chế tăng trưởng) được sử dụng cùng với các điều kiện thí nghiệm được dùng cho sự liên hợp này (như tỷ lệ tác nhân ức chế tăng trưởng /kháng thể, thời gian phản ứng, tính chất của dung môi và đồng dung môi nếu có. Do đó, tương tác giữa kháng thể và tác nhân ức chế tăng trưởng dẫn đến hỗn

hợp bao gồm một số thể liên hợp khác nhau bởi các tỉ lệ thuốc với kháng thể khác nhau; tuỳ ý là kháng thể trần; tuỳ ý là tổng hợp. Do đó DAR được xác định là giá trị trung bình.

Phương pháp có thể được sử dụng để xác định DAR gồm việc đo quang phổ kế tỷ lệ của độ hấp thụ ở dung dịch của thể liên hợp về cơ bản là tinh khiết ở λ_D và 280 nm. 280 nm là bước sóng thường được dùng để đo nồng độ protein, chẳng hạn như nồng độ kháng thể. Bước sóng λ_D được chọn để cho phép phân biệt thuốc với kháng thể, tức là dễ dàng được biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, λ_D là bước sóng mà tại đó thuốc có độ hấp thụ cao và λ_D là đủ xa 280 nm để tránh sự trùng lặp đáng kể ở các đỉnh hấp thụ của thuốc và kháng thể. λ_D có thể được chọn là 252 nm trong trường hợp của các phân tử maystansinoit. Phương pháp tính toán DAR có thể có được từ Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol 525, 445, Spring Science:

Các độ hấp thụ đối với thể liên hợp ở λ_D ($A\lambda_D$) và 280 nm (A_{280}) được đo hoặc trên đỉnh đơn phân của phân tích sắc kí loại trừ kích thước (SEC) (cho phép tính toán tham số "DAR(SEC)" hoặc sử dụng máy đo quang phổ cổ điển (cho phép tính toán tham số "DAR(UV). Các độ hấp thụ có thể được biểu diễn như sau:

$$A_{\lambda D} = (C_D \times \varepsilon_{D\lambda D}) + (C_A \times \varepsilon_{A\lambda D})$$

$$A_{280} = (C_D \times \varepsilon_{D280}) + (C_A \times \varepsilon_{A280})$$

trong đó:

• C_D và C_A tương ứng là các nồng độ trong dung dịch của thuốc và của kháng thể

• $\varepsilon_{D\lambda D}$ và ε_{D280} tương ứng là các hệ số tắt mol của thuốc tại λ_D và 280 nm

• $\varepsilon_{A\lambda D}$ và ε_{A280} tương ứng là các hệ số tắt mol của kháng thể tại λ_D và 280 nm.

Giải hai phương trình này với hai ẩn dẫn đến các phương trình sau đây:

$$C_D = [(\varepsilon_{A280} \times A_{\lambda D}) - (\varepsilon_{A\lambda D} \times A_{280})] / [(\varepsilon_{D\lambda D} \times \varepsilon_{A280}) - (\varepsilon_{A\lambda D} \times \varepsilon_{D280})]$$

$$C_A = [A_{280} - (C_D \times \varepsilon_{D280})] / \varepsilon_{A280}$$

Sau đó, DAR trung bình được tính từ tỷ lệ nồng độ thuốc với nồng độ kháng thể: DAR = C_D/C_A.

Dược phẩm

Các kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được kết hợp với tá dược có dược dụng phù hợp, và tùy ý chất kết dính giải phóng chậm, chẳng hạn như các polyme phân hủy sinh học, để tạo thành dược phẩm.

Do đó, một đối tượng khác của sáng chế là đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế và chất mang hoặc tá dược có dược dụng phù hợp.

Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, để dùng làm thuốc chữa bệnh.

"Dược dụng" hoặc "dược dụng phù hợp" là nói đến thực thể và thành phần phân tử mà không tạo ra phản ứng bất lợi, dị ứng hoặc rủi ro khác khi dùng cho động vật có vú, đặc biệt là người, khi thích hợp. Chất mang hoặc tá dược có dược dụng phù hợp là nói đến chất độn rắn, bán rắn hoặc lỏng không độc, chất pha loãng, chất bao gói hoặc công thức phụ trợ của bất kỳ loại nào .

Như được sử dụng trong tài liệu này, "các chất mang có dược dụng phù hợp" bao gồm bất kỳ và toàn bộ các dung môi, các chất trung gian phân tán, các chất phủ, các chất kháng khuẩn và chống nấm, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Các ví dụ về các chất mang, các chất pha loãng và/hoặc các tá dược phù hợp chứa một hoặc nhiều nước, các axit amin, muối, muối được đệm photphat, chất đệm photphat, axetat, xitrat, sucxinat; các axit amin và các dẫn xuất như histidin, arginin, Glyxin, prolin, glyxylglyxin; các muối vô cơ Nacl, canxi clorua; các đường hoặc các polyalcohol như dextroza, glyxerol, etanol, sucroza, trehaloza, manitol; các chất hoạt động bề mặt như Polysorbat 80, polysorbat 20, poloxamer 188; và chất tương tự, cũng như tổ hợp của chúng.

Trong nhiều trường hợp, nó sẽ là ưu tiên bao gồm các chất đẳng trương, chẳng hạn như các đường, các polyalcohol, hoặc natri clorua trong dược phẩm này, và dược phẩm này cũng có thể chứa chất chống oxy hóa như triptamin và một chất ổn định như Tween 20.

Hình thức của các dược phẩm, cách dùng, liều lượng và phác đồ tự nhiên phụ thuộc vào điều kiện điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh, tuổi, trọng lượng, và giới tính của bệnh nhân, v.v.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để dùng cho bôi, đường miệng, đường tiêm, đường mũi, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da hoặc đường mắt và cách dùng tương tự.

Theo một phương án, các dược phẩm có chứa các tá dược dược dụng phù hợp để pha chế có thể tiêm được. Các tác dược này có thể là các dung dịch đẳng trương, vô trùng, muối (mononatri hoặc dinatri phosphat, natri, kali, canxi hoặc magiê clorua và muối tương tự hoặc các hỗn hợp của các muối như vậy), hoặc các tá dược khô, đặc biệt là đông lạnh mà khi bổ sung, tùy từng trường hợp, nước tiệt trùng hoặc nước muối sinh lý, cho phép tạo thành thuốc nước có thể tiêm được.

Chế phẩm có thể được dùng thông qua các thiết bị kết hợp thuốc.

Liều dùng cho việc điều trị có thể được điều chỉnh như là hàm số của các tham số khác nhau, và ví dụ như là hàm số của phương thức điều trị được sử dụng, bệnh lý có liên quan, hoặc ngoài ra là thời gian điều trị mong muốn.

Để bào chế các dược phẩm, một lượng hiệu quả của kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang dược dụng hoặc môi trường nước.

Các dạng dược phẩm thích hợp cho dùng để tiêm bao gồm thuốc nước vô trùng hoặc phân tán; dược phẩm bao gồm dầu mè, dầu đậu phộng hoặc dung dịch propylen glycol; và bột vô trùng để pha chế ngay tức thì các dung dịch tiêm vô trùng hoặc các phân tán. Trong tất cả các trường hợp, dạng dược phẩm phải là vô trùng và có thể tiêm được với thiết bị hoặc hệ thống thích hợp để phân phối mà không làm giảm chất lượng dược phẩm. Nó phải được ổn định dưới các điều

kiện sản xuất và bảo quản và phải được giữ gìn chống lại tác động gây ô nhiễm của các vi sinh vật, chẳng hạn như vi khuẩn và nấm.

Các dung dịch của các hoạt chất như bazơ tự do hoặc các muối dược lý phù hợp có thể được pha chế trong nước trộn với chất hoạt động bề mặt thích hợp. Các phân tán cũng có thể được pha chế trong glyxerol, các polyetylen glycol dạng lỏng, và các hỗn hợp của chúng và trong các loại dầu. Dưới các điều kiện bảo quản và sử dụng thông thường, các pha chế này chứa chất bảo quản để ngăn ngừa sự phát triển của các vi sinh vật.

Polipeptit, kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được bào chế thành dược phẩm ở dạng trung tính hoặc muối. Các muối dược dụng phù hợp bao gồm các muối cộng axit (được tạo thành với các nhóm amin tự do của protein) và được tạo thành với các axit vô cơ, ví dụ như axit clohydric hoặc axít photphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, oxalic, tactric, mandelic, và axit tương tự. Các muối được tạo thành với các nhóm cacboxyl tự do cũng có thể được lấy từ các bazơ vô cơ, ví dụ như natri, kali, amoni, canxi, hoặc sắt hydroxit, và các bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, glyxin, histidin, procain và bazơ tương tự.

Chất mang cũng có thể là dung môi hoặc dung dịch phân tán chứa, ví dụ như nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glicol dạng lỏng, và chất tương tự), các hỗn hợp thích hợp của chúng, và các loại dầu thực vật. Độ loãng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ, chẳng hạn như lexithin, bởi việc duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Việc ngăn ngừa hoạt động của các vi sinh vật có thể có được bởi các tác nhân kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ như các paraben, clorobutanol, phenol, axit sorbic, thimerosal và tác nhân tương tự. Trong nhiều trường hợp, nó sẽ là ưu tiên để chứa các tác nhân đẳng trương, ví dụ như các loại đường hoặc natri clorua. Sự hấp thụ kéo dài của các dược phẩm tiêm có thể có được bằng cách cho vào các dược phẩm này các tác nhân làm chậm sự hấp thụ, ví dụ như nhôm monostearat và gelatin.

Các dung dịch tiêm vô trùng được pha chế bằng cách kết hợp các hoạt chất với lượng yêu cầu trong dung môi thích hợp với thành phần bất kỳ trong số các thành phần được liệt kê ở trên, khi cần, tiếp theo bởi quá trình khử trùng lọc. Nói chung, các phân tán được pha chế bằng cách kết hợp các thành phần hoạt tính vô trùng khác nhau vào tá dược lỏng vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản dạng bazơ và các thành phần khác theo yêu cầu trong số các thành phần được liệt kê ở trên. Trong trường hợp của bột vô trùng để pha chế các dung dịch tiêm vô trùng, các phương pháp pha chế được ưu tiên là các phương pháp sấy chân không và đông khô mà thu được bột của các thành phần hoạt tính cộng với thành phần bất kỳ được mong muốn thêm vào từ dung dịch được lọc vô trùng trước của nó.

Việc pha chế các dung dịch đậm đặc hơn, hoặc rất đặc dùng để tiêm trực tiếp cũng được dự tính, ở đó việc sử dụng DMSO làm dung môi được hình dung dẫn đến sự xâm nhập rất nhanh chóng, phân phối hàm lượng cao của các hoạt chất đến khu vực khối u nhỏ.

Nhờ sự pha chế, các dung dịch thuốc nước sẽ được dùng theo cách phù hợp với liều lượng pha chế và ở lượng mà là hiệu quả về mặt trị liệu. Các thuốc pha chế được dùng một cách dễ dàng ở nhiều dạng liều lượng, chẳng hạn như dạng các dung dịch tiêm được mô tả ở trên, nhưng viên nang giải phóng thuốc và dạng tương tự cũng có thể được sử dụng.

Để dùng cho ngoài đường tiêu hoá trong dung dịch nước, ví dụ, dung dịch sẽ được đệm phù hợp nếu cần thiết và chất pha loãng chất lỏng đầu tiên được làm cho trương lực với đủ dung dịch muối hoặc glucozơ. Các dung dịch thuốc nước này là đặc biệt thích hợp dùng cho tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da và trong phúc mạc. Liên quan đến điều này, môi trường nước vô trùng có thể được dùng sẽ được biết đến với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dưới ánh sáng của việc bộ lộ này. Ví dụ, một liều lượng có thể được hòa tan trong 1 ml dung dịch Nacl đẳng trương và hoặc bổ sung vào 1000 ml dịch truyền dưới da hoặc tiêm tại vị trí tiêm được đề xuất, (ví dụ xem "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, các trang từ 1035 đến 1038 và từ 1570

đến 1580). Một số thay đổi về liều lượng sẽ cần phải xảy ra tùy thuộc vào tình trạng của đối tượng đang được điều trị. Người chịu trách nhiệm cho việc điều trị này, trong mọi trường hợp, sẽ xác định liều lượng thích hợp cho từng đối tượng.

Kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được bào chế trong một hỗn hợp trị liệu bao gồm khoảng từ 0,01 đến 100 miligram, mỗi liều hoặc như vậy.

Ngoài kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa, chẳng hạn như tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm bắp, các dạng dược dụng phù hợp khác gồm có, ví dụ như các viên nén hoặc các dạng rắn khác dùng cho đường miệng; viên nang giải phóng theo thời gian; và bất kỳ dạng nào khác hiện đang dùng.

Theo các một số phương án, việc dùng các hạt mỡ và/hoặc các hạt nano được cân nhắc để đưa các polypeptit vào tế bào chủ. Việc tạo ra và dùng các hạt mỡ và/hoặc các hạt nano được biết đến với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các viên nang nano thường có thể bẫy các hợp chất theo cách ổn định và tái sản xuất được. Để tránh các tác dụng phụ do sự quá tải polyme trong tế bào, các hạt siêu mịn như vậy (có kích thước khoảng 0,1 μm) thường được thiết kế bằng cách sử dụng các polyme có thể bị phân huỷ trong cơ thể. Các hạt nano polyalkyl-xyanoacrylat phân hủy sinh học, hoặc các hạt nano polylactit hoặc polylactit-coglycolit phân hủy sinh học mà đáp ứng các yêu cầu này được cân nhắc để dùng trong sáng chế, và các hạt như vậy có thể được tạo ra dễ dàng.

Các hạt mỡ được tạo thành từ các photpholipit được phân tán trong dung dịch nước và tạo thành thành các túi hai lớp đồng tâm đa lớp một cách tự nhiên (còn được gọi là các túi đa lớp (MLVs)). MLVs thường có các đường kính nằm trong khoảng từ 25 nm đến 4 μm. Sử dụng năng lượng sóng siêu âm đối với MLVs dẫn đến sự tạo thành các túi đơn lớp nhỏ (SUVs) với các đường kính nằm trong khoảng từ 200 đến 500 Å, chứa dung dịch nước trong lõi. Các đặc tính vật lý của các hạt mỡ phụ thuộc vào độ pH, cường độ ion và sự có mặt của các cation hóa trị hai.

Các phương pháp điều trị và cách dùng

Các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng năm kháng thể mà họ đã tạo ra có khả năng tiếp nhận phức hợp CEACAM5-kháng thể sau khi liên kết. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng các kháng thể này kết hợp với maytansinoit gây độc tế bào (DM4), tạo ra hoạt tính gây độc tế bào trên các tế bào khối u MKN45 ở người in vitro. Các tác giả sáng chế cũng đã chỉ ra rằng các thể liên hợp miễn dịch tạo ra hoạt tính chống khối u được đánh dấu in vivo ở mẫu ghép mô dị chủng với chuột của khối u đại tràng nguyên phát ở người được lấy từ bệnh nhân, khi được dùng ở liều 5 mg/kg và 2,5 mg/kg, với một mũi tiêm ở ngày thứ 14 sau cấy ghép khối u.

Như vậy, các polypeptit, các kháng thể, các thể liên hợp miễn dịch, hoặc các dược phẩm theo sáng chế có thể hữu ích để điều trị ung thư.

Bệnh ung thư được điều trị bằng các kháng thể, các thể liên hợp miễn dịch, hoặc các dược phẩm theo sáng chế là ung thư biểu hiện CEACAM5, cụ thể là biểu hiện quá mức CEACAM5 so với (nghĩa là tăng trưởng bình thường) các tế bào bình thường có cùng nguồn gốc mô. Biểu hiện của CEACAM5 bởi các tế bào ung thư có thể được khảo nghiệm dễ dàng ví dụ bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế, như được mô tả trong phần tiếp theo "dùng chẩn đoán", và đặc hiệu là bằng phương pháp hoá mô miễn dịch ví dụ như được mô tả trong ví dụ 8.

Theo một phương án, ung thư có thể là ung thư đại trực tràng, dạ dày, phổi, tử cung cổ tử cung, tuyến tụy, thực quản, buồng trứng, tuyến giáp, bàng quang, nội mạc tử cung, vú, gan (ví dụ như ung thư đường mật), tuyến tiền liệt, hoặc ung thư da. Sàng lọc một bảng các khối u ở người bằng hóa mô miễn dịch bằng cách dùng kháng thể CEACAM5 kháng nhân của chuột theo sáng chế thực sự cho thấy kháng thể nhuộm màu các loại ung thư này, như được mô tả chi tiết hơn trong Ví dụ 8.

Các kháng thể hoặc các thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với bất kỳ tác nhân ức chế tăng trưởng nào phù hợp.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp hoặc liên kết với tác nhân ức chế tăng trưởng, tác nhân gây độc tế bào, hoặc enzym hoạt hoá tiền chất thuốc như được mô tả trước đây. Các kháng thể theo sáng chế có thể là thực sự hữu ích cho mục đích làm tác nhân ức chế sự tăng trưởng, tác nhân gây độc tế bào, hoặc tiền chất thuốc đối với việc biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức các tế bào ung thư CEACAM5 trên bề mặt của chúng.

Nó cũng được biết đến rộng rãi rằng các kháng thể đơn dòng điều trị có thể dẫn đến sự suy giảm của các tế bào mang kháng nguyên đặc hiệu được công nhận bởi kháng thể này. Sự suy giảm này có thể được trung gian qua ít nhất ba cơ chế: độc tính tế bào qua trung gian kháng thể(ADCC), sự ly giải phụ thuộc bổ thể , và sự ức chế chống khối u trực tiếp của sự phát triển khối u qua các tín hiệu được đưa ra qua kháng nguyên là mục tiêu của các kháng thể.

"Độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể" hoặc "CDC" đề cập đến sự ly giải của tế bào đích với sự có mặt của bổ thể. Sự hoạt hóa của con đường bổ thể cổ điển được khởi xướng bởi sự liên kết của thành phần đầu tiên của hệ thống bổ thể với các kháng thể được liên kết với kháng nguyên cùng nguồn gốc của chúng. Để đánh giá sự hoạt hoá bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện, ví dụ như được mô tả trong Gazzano-Santoro et al. (1997).

"Độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" hoặc "ADCC" đề cập đến một dạng độc tính tế bào trong đó các kháng thể được tiết ra gắn lên các thụ thể Fc (FCRs) có mặt trên các tế bào gây độc tế bào nhất định (ví dụ như các tế bào Natural killer (NK), bạch cầu trung tính và đại thực bào) cho phép các tế bào phản ứng lại kích thích gây độc tế bào này liên kết đặc hiệu với tế bào đích mang kháng nguyên và sau đó giết chết tế bào đích này. Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm, thử nghiệm ADCC in vitro có thể được thực hiện, như được mô tả trong US Patent No. 5.500.362 hoặc 5.821.337.

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp điều trị ung thư bao gồm việc điều trị cho đối tượng cần điều trị với lượng có hiệu quả về mặt trị liệu của polypeptit, kháng thể, thể liên hợp miễn dịch hoặc dược phẩm theo sáng chế.

Trong phạm vi của sáng chế, thuật ngữ "điều trị" hoặc "chữa trị", như được dùng trong tài liệu này, có nghĩa là đảo ngược, làm giảm, ức chế sự phát triển của, hoặc ngăn ngừa sự rối loạn hoặc tình trạng theo đó thuật ngữ này áp dụng, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của sự rối loạn hoặc tình trạng đó. Bằng thuật ngữ "điều trị ung thư" như được dùng trong tài liệu này có nghĩa là sự ức chế sự tăng trưởng của các tế bào ác tính của khối u và/hoặc sự phát triển của di căn từ khối u đó. Việc chữa trị như vậy cũng có thể dẫn tới sự thoái hoá sự phát triển khối u, tức là, sự giảm về kích thước của khối u có thể đo được. Cụ thể là, việc chữa trị này dẫn đến sự thoái hóa hoàn toàn của khối u hoặc di căn.

Theo sáng chế, thuật ngữ "bệnh nhân" hoặc “bệnh nhân cần điều trị” được dùng cho con người hoặc động vật có vú không phải người bị ảnh hưởng hoặc có thể bị ảnh hưởng với khối u ác tính. Cụ thể là, bệnh nhân này có thể là bệnh nhân đã được xác định là nhạy cảm với tác nhân trị liệu đích CEACAM5, cụ thể là với kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, ví dụ theo phương pháp như được mô tả dưới đây.

Bằng "lượng có hiệu quả về mặt trị liệu" của polypeptit theo sáng chế có nghĩa là lượng polypeptit đủ để điều trị bệnh ung thư đã nêu, ở tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý áp dụng cho bất kỳ chữa trị y tế nào. Tuy nhiên, điều đó sẽ được hiểu là tổng liều lượng sử dụng hàng ngày các polypeptit và các dược phẩm theo sáng chế sẽ được quyết định bởi các bác sĩ tham gia trong phạm vị đánh giá y khoa hợp lý. Mức liều lượng có hiệu quả điều trị đặc hiệu cho bệnh nhân bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố gồm sự rối loạn được điều trị và mức độ nghiêm trọng của sự rối loạn này; hoạt tính của polypeptit đặc hiệu được sử dụng; thành phần đặc thù được sử dụng, tuổi, trọng lượng cơ thể, sức khỏe nói chung, giới tinhs và chế độ ăn uống của bệnh nhân; thời gian dùng, cách dùng, và tốc độ bài tiết của polypeptit đặc hiệu được sử dụng; thời gian điều trị; các thuốc dùng kết hợp hoặc trùng hợp ngẫu nhiên với polypeptit đặc hiệu được sử dụng; và các yếu tố tương tự được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật y khoa này. Ví dụ, nó được biết đến một cách rộng rãi bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật y khoa này là bắt đầu với các liều lượng ở các mức thấp hơn yêu cầu để đạt

đượcc hiệu quả trị liệu mong muốn và tăng dần liều lượng cho đến khi đạt được hiệu quả mong muốn.

Một mục đích khác của sáng chế là đề cập đến polypeptit, kháng thể, thể liên hợp miễn dịch hoặc dược phẩm theo sáng chế để dùng trong việc điều trị khối u ác tính.

Polypeptit, kháng thể, thể liên hợp miễn dịch hoặc dược phẩm có thể được dùng để ức chế sự phát triển của di căn của khối u ác tính.

Polypeptit theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với phương pháp trị liệu khác để điều trị khối u ác tính (ví dụ như liệu pháp bổ trợ), và/hoặc làm giảm sự phát triển của khối u di căn.

Hiệu quả của việc điều trị bằng kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể dễ dàng được khảo nghiệm in vivo, ví dụ như trên mẫu ung thư của chuột và bằng cách đo, ví dụ như, những thay đổi về thể tích khối u giữa các nhóm được điều trị và so sánh, tỷ lệ phần trăm suy thoái khối u, sự suy thoái một phần và/hoặc sự suy thoái hoàn toàn như được xác định trong Ví dụ 5.3.

Sử dụng cho chẩn đoán

CEACAM5 đã được báo cáo là biểu hiện cao trên bề mặt các tế bào khối u đại trực tràng, dạ dày, phổi, tử cung và biểu hiện yếu ở vài tế bào biểu mô bình thường như các tế bào biểu mô ruột và thực quản. Ngoài ra, sàng lọc một bảng các khối u ở người bằng hóa mô miễn dịch bằng cách dùng kháng thể CEACAM5 kháng nhân của chuột theo sáng chế cho thấy kháng thể nhuộm màu các bệnh ung thư trực tràng, dạ dày, phổi, cổ tử cung, tuyến tụy, thực quản, buồng trứng, tuyến giáp, bàng quang, tử cung, vú, gan (cụ thể là ung thư đường mật), tuyến tiền liệt, và da.

Vì vậy, CEACAM5 tạo thành chất đánh dấu ung thư và, do đó, có tiềm năng được dùng để chỉ ra tính hiệu quả của liệu pháp chống ung thư hoặc phát hiện sự tái phát của bệnh ung thư.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế được dùng làm thành phần của thử nghiệm trong phạm vi liệu pháp nhắm mục tiêu các khối u biểu hiện CEACAM5, để xác định tính nhạy cảm của bệnh nhân với tác nhân trị liệu, theo

dõi tính hiệu quả của liệu pháp chống ung thư hoặc phát hiện sự tái phát của bệnh ung thư sau khi điều trị. Cụ thể là, cùng một kháng thể theo sáng chế được dùng cả cho làm thành phần của các tác nhân trị liệu và làm thành phần của thử nghiệm chẩn đoán.

Do đó, một mục đích khác của sáng chế là đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng cho việc phát hiện biểu hiện của CEACAM5 ở đối tượng in vovo, hoặc dùng cho việc phát hiện biểu hiện của CEACAM5 trong mẫu sinh học của đối tượng ex vivo. Sự phát hiện này có thể nhằm để, cụ thể là:

a) chẩn đoán sự có mặt của ung thư ở đối tượng, hoặc

b) xác định tính mẫn cảm của bệnh nhân ung thư với tác nhân trị liệu nhắm mục tiêu CEACAM5, cụ thể là thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, hoặc

c) theo dõi tính hiệu quả của liệu pháp chống ung thư CEACAM5 hoặc phát hiện sự tái phát ung thư sau khi điều trị bằng liệu pháp chống ung thư CEACAM5, cụ thể là để điều trị với thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế;
bằng cách phát hiện biểu hiện của protein CEACAM5 bề mặt trên các tế bào khối u.

Theo một phương án, kháng thể được dùng để sử dụng in vitro hoặc ex vivo. Ví dụ, CEACAM5 có thể được phát hiện in vitro hoặc ex vivo trong mẫu sinh học thu được từ đối tượng, bằng cách dùng kháng thể theo sáng chế. Việc dùng theo sáng chế cũng có thể là dùng in vivo. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế được dùng cho đối tượng và các phức hợp kháng thể-các tế bào được phát hiện và/hoặc định lượng, nhờ đó việc phát hiện các phức hợp đã nêu là biểu hiện của bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của bệnh ung thư ở đối tượng in vitro hoặc ex vivo, bao gồm các bước:

(a) cho tiếp xúc mẫu sinh học của đối tượng với kháng thể theo sáng chế, cụ thể là trong các điều kiện đủ để kháng thể này tạo thành các phức hợp với mẫu sinh học đã nêu;

(b) đo mức kháng thể liên kết với mẫu sinh học đã nêu,

(c) phát hiện sự có mặt của ung thư bằng cách so sánh mức kháng thể được liên kết đo được với mẫu đối chứng, mức kháng thể được liên kết tăng liên so với mẫu đối chứng là biểu hiện của bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định tính mẫn cảm của bệnh nhân ung thư với tác nhân điều trị nhắm mục tiêu CEACAM5 in vitro hoặc ex vivo, cụ thể là với thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho tiếp xúc mẫu sinh học của bệnh nhân bị ung thư với kháng thể theo sáng chế, cụ thể là trong các điều kiện đủ để kháng thể tạo thành các phức hợp với mẫu sinh học đã nêu;

(b) đo mức kháng thể liên kết với mẫu sinh học đã nêu,

(c) so sánh mức kháng thể được liên kết đo được với mẫu sinh học đã nêu với mức kháng thể được liên kết với mẫu đối chứng;

trong đó, mức kháng thể được liên kết với mẫu sinh học đã nêu tăng lên so với mẫu đối chứng là dấu hiệu của bệnh nhân mẫn cảm với tác nhân trị liệu nhắm mục tiêu CEACAM5.

Trong các phương pháp ở trên, mẫu đối chứng đã nêu có thể mẫu sinh học bình thường, không ung thư cùng loại, hoặc giá trị tham chiếu được xác định làm đại diện của mức liên kết kháng thể trong mẫu sinh học bình thường cùng loại.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế hữu ích cho việc chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện CEACAM5, chẳng hạn như ung thư đại trực tràng, dạ dày, phổi, cổ tử cung, tuyến tụy, thực quản, buồng trứng, tuyến giáp, bàng quang, tử cung, vú, gan (cụ thể là ung thư đường mật), tuyến tiền liệt, hoặc ung thư da.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp in vitro hoặc ex vivo theo dõi tính hiệu quả của liệu pháp chống ung thư CEACAM5, bao gồm các bước:

(a) cho tiếp xúc mẫu sinh học của đối tượng trải qua liệu pháp chống ung thư CEACAM5, với kháng thể theo sáng chế, cụ thể là trong các điều kiện đủ để kháng thể để tạo thành các phức hợp với mẫu sinh học đã nêu;

(b) đo mức kháng thể được liên kết với mẫu sinh học đã nêu,

(c) so sánh mức kháng thể được liên kết đo được với mức kháng thể được liên kết với mẫu đối chứng;

trong đó, mức kháng thể được liên kết với mẫu sinh học đã nêu giảm xuống so với mẫu đối chứng là biểu hiện của tính hiệu quả của liệu pháo chống ung thư CEACAM5 đã nêu.

Trong phương pháp đã nêu, mức kháng thể được liên kết với mẫu sinh học đã nêu tăng lên so với mẫu đối chứng là dấu hiệu của sự tính không hiệu quả của liệu pháp chống ung thư CEACAM5 đã nêu.

Theo một phương án, mẫu đối chứng đã nêu là mẫu sinh học cùng loại với mẫu sinh học được đưa vào phân tích, nhưng mẫu này được lấy từ đối tượng trong thời gian trước đó, trong quá trình của liệu pháp chống ung thư CEACAM5.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp in vitro hoặc ex vivo phát hiện tái phát ung thư sau liệu pháp chống ung thư CEACAM5, bao gồm các bước:

(a) cho tiếp xúc mẫu sinh học đối tượng đã hoàn tất liệu pháp chống ung thư CEACAM5, với kháng thể theo sáng chế, cụ thể là trong các điều kiện đủ để kháng thể tạo thành các phức hợp với mẫu sinh học đã nêu;

(b) đo mức kháng thể được liên kết với mẫu sinh học đã nêu,

(c) so sánh mức kháng thể được liên kết đo được với mức kháng thể được liên kết với mẫu đối chứng;

trong đó, mức kháng thể được liên kết với mẫu sinh học đã nêu tăng lên so với mẫu đối chứng là dấu hiệu của bệnh ung thư tái phát sau liệu pháp chống ung thư CEACAM5.

Mẫu đối chứng đã nêu, mà cụ thể là mẫu sinh học cùng loại với mẫu sinh học được đưa vào phân tích, nhưng mẫu này được lấy từ đối tượng trong thời gian trước đó, trong hoặc sau khi hoàn tất liệu pháp chống ung thư CEACAM5.

Liệu pháp chống ung thư CEACAM5 đã nêu, cụ thể là liệu pháp dùng kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. –Liệu pháp chống ung thư

CEACAM5 đã nêu nhắm mục tiêu bệnh ung thư biểu hiện CEACAM5, cụ thể là ung thư đại trực tràng, dạ dày, phổi,

cổ tử cung, tuyến tụy, thực quản, buồng trứng, tuyến giáp, bàng quang, tử cung, vú, gan (cụ thể là ung thư đường mật), tuyến tiền liệt, hoặc ung thư da.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể được dán nhãn với phân tử hoặc chất có thể phát hiện được, chẳng hạn như phân tử huỳnh quang, phân tử phóng xạ hoặc bất kỳ các phân tử dán nhãn khác đã biết trong việc cung cấp tín hiệu đó (hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp).

Như được dùng trong tài liệu này, thuật ngữ "được dán nhãn", liên quan đến kháng thể theo sáng chế, được dùng để bao gồm việc dán nhãn trực tiếp kháng thể bằng cách kết nối (tức là, liên kết vật lý) chất có thể phát hiện được , chẳng hạn như chất phóng xạ hoặc chất huỳnh quang (ví dụ như floretxein isothioxyanat (FITC) hoặc phycoerythrin (PE) hoặc Indoxyanin (Cy5)) với polypeptit, cũng như dán nhãn gián tiếp polypeptit này bằng phản ứng với chất có thể phát hiện được.

Kháng thể theo sáng chế có thể được dán nhãn với phân tử phóng xạ bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các phân tử phóng xạ bao gồm nhưng không giới hạn với nguyên tử phóng xạ cho các nghiên cứu xạ hình như I^{123}, I^{124}, In^{111}, Re^{186}, Re^{188}, Tc^{99}. Các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được dán nhãn với nguyên tử dán nhãn quay cho chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (cũng được biết đến là chụp cộng hưởng từ MRI), như iot-123, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

"Mẫu sinh học" bao gồm một loạt các loại mẫu thu được từ đối tượng và có thể được dùng trong thử nghiệm chẩn đoán hoặc theo dõi. Các mẫu sinh học bao gồm nhưng không giới hạn với các mẫu máu và chất lỏng khác có nguồn gốc sinh học, các mẫu mô rắn như mẫu sinh thiết hoặc mô nuôi cấy hoặc các tế bào thu được từ đó, và thế hệ con cháu của nó. Do đó, các mẫu sinh học bao gồm các mẫu bệnh phẩm, các tế bào trong nuôi cấy, dịch chiết tế bào, lysates tế

bào, huyết thanh, huyết tương, chất lỏng sinh học, và các mẫu mô, cụ thể là mẫu khối u.

Theo một phương án, các mẫu sinh học có thể là mẫu mô được cố định bằng formalin và nhúng paraffin (FFPE). Thật vậy, các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng một cách thuận lợi trên các mô FFPE là định dạng được dùng bởi hầu hết các bệnh viện để thu gom và lưu trữ các mẫu mô.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp in vitro phát hiện sự có mặt của bệnh ung thư ở đối tượng, bao gồm các bước:

a) dùng kháng thể theo sáng chế được dán nhãn có thể phát hiện được cho bệnh nhân;

b) phát hiện vị trí của kháng thể được dãn nhãn có thể phát hiện được đã nêu ở bệnh nhân bằng ảnh chụp.

Các kháng thể theo sáng chế có thể hữu ích trong việc phân chia giai đoạn của bệnh ung thư (ví dụ, trong chụp phóng xạ). Chúng có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với các chất đánh dấu ung thư khác.

Các thuật ngữ "sự phát hiện" hoặc "được phát hiện" như được dùng trong tài liệu này bao gồm sự phát hiện định tính và/hoặc định lượng (đo các mức) có hoặc không có tham chiếu với đối chứng.

Trong phạm vi của sáng chế, thuật ngữ "chẩn đoán", như được dùng trong tài liệu này, có nghĩa là việc xác định tính chất của một tình trạng y tế nhằm xác định bệnh lý ảnh hưởng đến đối tượng từ số dữ liệu thu gom được.

Trong phương pháp đã nêu, bệnh ung thư là ung thư biểu hiện CEACAM5, cụ thể là ung thư đại trực tràng, dạ dày, phổi, cổ tử cung, tuyến tụy, thực quản, buồng trứng, tuyến giáp, bàng quang, tử cung, vú, gan (cụ thể là ung thư đường mật), tuyến tiền liệt, hoặc ung thư da.

Các bộ kit

Cuối cùng, sáng chế cũng đề xuất các bộ kit bao gồm ít nhất một kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Các bộ kit có chứa các kháng thể theo sáng chế được dùng trong việc phát hiện protein bề mặt CEACAM5, hoặc trong các thử nghiệm trị liệu hoặc chẩn đoán. Các bộ kit theo sáng chế có thể

chứa polypeptit hoặc kháng thể được kết hợp với một hỗ trợ rắn, ví dụ như tấm nuôi cấy mô hoặc các hạt (ví dụ như hạt sepharoza). Các bộ kit được đề xuất có thể chứa các kháng thể để phát hiện và định lượng protein bề mặt CEACAM5 in vitro, ví dụ như bằng ELISA hoặc Western blot. Kháng thể có ích cho việc phát hiện như vậy có thể được đề xuất với chất dán nhãn như chất huỳnh quang hoặc chất dán nhãn phóng xạ.

Mô tả tóm tắt các trình tự

SEQ ID NO:1-4, và 6 cho thấy các trình tự của CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L và CDR3-L của kháng thể còn được gọi là "MAb1".

SEQ ID NO:5 cho thấy trình tự biến đổi VH VH1a của kháng thể được nhân hoá MAb2.

SEQ ID NO:7-10, và 12 cho thấy các trình tự của CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L và CDR3-L của kháng thể còn được gọi là "MAb2".

SEQ ID NO:11 cho thấy trình tự của CEACAM1 ở người có sẵn từ GenBank NP_001703.2.

SEQ ID NO:13-16, và 18 cho thấy các trình tự của CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L và CDR3-L của kháng thể còn được gọi là "MAb3".

SEQ ID NO:17 cho thấy trình tự biến đổi VL VL1 của kháng thể được nhân hoá MAb2.

SEQ ID NO:19-22, và 24 cho thấy các trình tự của CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L và CDR3-L của kháng thể còn được gọi là "MAb4".

SEQ ID NO:23 cho thấy các trình tự biến đổi VL VL1a của kháng thể được nhân hoá MAb2.

SEQ ID NO:25-28, và 30 cho thấy các trình tự của CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L và CDR3-L của kháng thể còn được gọi là "MAb5".

SEQ ID NO:29 cho thấy các trình tự biến đổi Vl VL1 của kháng thể được nhân hoá MAb2.

SEQ ID NO:31 cho thấy trình tự VH của kháng thể “Mab1”.

SEQ ID NO:32 thể hiện trình tự VL của kháng thể “Mab1”.

SEQ ID NO:33 cho thấy trình tự VH của kháng thể “Mab2”.

SEQ ID NO:34 cho thấy trình tự VL của kháng thể "Mab2".

SEQ ID NO:35 cho thấy trình tự VH của kháng thể "Mab3".

SEQ ID NO:36 cho thấy trình tự VL của kháng thể "Mab3".

SEQ ID NO:37 cho thấy trình tự VH của kháng thể "Mab4".

SEQ ID NO:38 cho thấy trình tự VL của kháng thể "Mab4".

SEQ ID NO:39 cho thấy trình tự VH của kháng thể "Mab5".

SEQ ID NO:40 cho thấy trình tự VL của kháng thể "Mab5".

SEQ ID NO:41 cho thấy trình tự chuỗi nặng của kháng thể chMAb1.

SEQ ID NO:42 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể chMAb1.

SEQ ID NO:43 cho thấy trình tự chuỗi nặng của kháng thể chMAb2.

SEQ ID NO:44 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể chMAb2.

SEQ ID NO:45 cho thấy trình tự chuỗi nặng của kháng thể chMAb3.

SEQ ID NO:46 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể chMAb3.

SEQ ID NO:47 cho thấy trình tự chuỗi nặng của kháng thể chMAb4.

SEQ ID NO:48 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể chMAb4.

SEQ ID NO:49 cho thấy trình tự chuỗi nặng của kháng thể chMAb5.

SEQ ID NO:50 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể chMAb5.

SEQ ID NO:51 cho thấy trình tự biến đổi VH VH1 của kháng thể được nhân hoá MAb2.

SEQ ID NO:52 cho thấy trình tự của CEACAM5 ở người có chiều dài đầy đủ có sẵn từ cơ sở dữ liệu GenBank theo số truy cập AAA51967.1.

SEQ ID NO:53 cho thấy trình tự của miền ngoại bào của CEACAM5 của khỉ *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:54 cho thấy trình tự của chuỗi nhẹ của kháng thể thể khảm (có nguồn gốc từ kháng thể "MAb2") bao gồm đột biến K52 thành R52.

SEQ ID NO:55 cho thấy trình tự biến đổi VL VL1d của kháng thể được nhân hoá MAb2.

SEQ ID NO:56 cho thấy trình tự của miền ngoại bào hCEACAM1 (các vị trí từ 35 đến 428 của hCEACAM1 có chiều dài đầy đủ (NP_001703.2), tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag).

SEQ ID NO:57 cho thấy trình tự của miền ngoại bào cCEACAM1 tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:58 cho thấy trình tự của miền ngoại bào hCEACAM5 (các vị trí từ 35 đến 685 của hCEACAM5 có chiều dài đầy đủ (AAA51967.1) tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag).

SEQ ID NO:59 cho thấy trình tự của miền ngoại bào cCEACAM5 tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:60 cho thấy trình tự của miền ngoại bào hCEACAM6 (các vị trí từ 35 đến 327 của hCEACAM6 có chiều dài đầy đủ (NP_002474.3), tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag).

SEQ ID NO:61 cho thấy trình tự của miền ngoại bào cCEACAM6 tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:62 cho thấy trình tự của miền ngoại bào hCEACAM8 (các vị trí từ 35 đến 332 của hCEACAM8 có chiều dài đầy đủ (NP_001807.2), tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:63 cho thấy trình tự của miền ngoại bào cCEACAM8, tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:64 cho thấy trình tự của miền ngoại bào hCEACAM7 (các vị trí từ 36 đến 248 của hCEACAM7 có chiều dài đầy đủ (NP_008821.1), tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag).

SEQ ID NO:65 cho thấy trình tự của hCEACAM5 N-A1-B1 (các vị trí từ 35 đến 320 của hCEACAM5 có chiều dài đầy đủ (AAA51967.1)) tiếp theo axit amin 6 His-Tag.

SEQ ID NO:66 cho thấy trình tự của hCEACAM5- A2-B2 (các vị trí từ 321 đến 498 của hCEACAM5 có chiều dài đầy đủ (AAA51967.1)) tiếp theo axit amin 6 His-Tag.

SEQ ID NO:67 cho thấy trình tự của hCEACAM5 A3-B3 (các vị trí từ 499 đến 685 của hCEACAM5 có chiều dài đầy đủ (AAA51967.1)) tiếp theo axit amin 6 His-Tag.

SEQ ID NO:68 cho thấy trình tự của cCEACAM5 N-A1-B1, tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:69 cho thấy trình tự của cCEACAM5 A2-B2, tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:70 cho thấy trình tự của cCEACAM5 A3-B3, tiếp theo phần mở rộng axit amin 24 chứa His-Tag.

SEQ ID NO:71 cho thấy trình tự của protein có chiều dài đầy đủ CEACAM6 ở người như có sẵn từ GenBank NP_002474.3.

SEQ ID NO:72 cho thấy trình tự của protein có chiều dài đầy đủ CEACAM7 ở người như có sẵn từ GenBank NP_008821.1.

SEQ ID NO:73 cho thấy trình tự của protein có chiều dài đầy đủ CEACAM8 ở người như có sẵn trong GenBank NP_001807.2.

SEQ ID NO:74 cho thấy trình tự VH của MAb2_VLg5VHg2 được nhân hoá biến đổi.

SEQ ID NO:75 cho thấy trình tự VL của MAb2_VLg5VHg2 được nhân hoá biến đổi.

SEQ ID NO:76 cho thấy trình tự của các axit amin ở các vị trí từ 109 đến 115 của CEACAM5 A3-B3 ở người.

SEQ ID NO:77 cho thấy trình tự của các axit amin ở các vị trí từ 131 đến 143 của CEACAM5 A3-B3 ở người.

SEQ ID NO:78 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR1-H của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên những nét tương đồng trình tự.

SEQ ID NO:79 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR2-H của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên những nét tương đồng trình tự.

SEQ ID NO:80 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR3-H của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên những nét tương đồng trình tự.

SEQ ID NO:81 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR1-H của họ kháng thể MAb1/MAb3.

SEQ ID NO:82 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR2-H của họ kháng thể MAb1/MAb3.

SEQ ID NO:83 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR1-H của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên các gốc được xác định là trung tính trong liên kết của các miền ngoại bào CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:84 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR3-H của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên các gốc được xác định là trung tính trong liên kết của các miền ngoại bào CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:85 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR1-L của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên các gốc được xác định là trung tính trong liên kết của các miền ngoại bào CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:86 cho thấy trình tự liên ứng đối với CDR3-L của họ kháng thể MAb2/MAb4/MAb5 dựa trên các gốc được xác định là trung tính trong liên kết của các miền ngoại bào CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:87 cho thấy trình tự chuỗi nặng của huMAb2-3 (MAb2_VL1cVH1a-IgG1).

SEQ ID NO:88 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của huMAb2-3 (MAb2_VL1cVH1a-IgG1).

SEQ ID NO:89 cho thấy trình tự chuỗi nặng của huMAb2-4 (MAb2_VL1dVH1-IgG1).

SEQ ID NO:90 cho thấy trình tự chuỗi nhẹ của huMAb2-4 (MAb2_VL1dVH1-IgG1).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa bằng các những ví dụ tiếp theo mà sẽ không được hiểu là sự giới hạn hơn nữa.

Ví dụ 1: bào chế các miền ngoại bào tái tổ hợp của các protein CEACAM

Trong ví dụ này, các miền ngoại bào protein (ECD) của CEACAM có nguồn gốc từ người (h) hoặc khỉ cynomolgus (c) đã được bào chế bằng cách biểu hiện tạm thời trong các tế bào thận phôi thai người K293 với các plasmit cho phép biểu hiện của cADN tương ứng như được nêu ở bảng 1.

Mỗi plasmit biểu hiện đã được tạo phức với 293fectin™ (Life Technologies) và thêm vào các tế bào 293-F được nuôi trong huyền phù (có

nguồn gốc từ các tế bào HEK293). Tám ngày sau khi truyền nhiễm, các phần váng nuôi cấy đã được thu gom và các protein hòa tan tương ứng đã được tinh chế bằng IMAC (GE Healthcare) để tạo ra một mẻ protein (xem Bảng 1).

Bảng 1: Mô tả các miền ngoại bào tái tổ hợp của các protein CEACAM

Tên protein	Mô tả protein	Nguồn gốc trình tự cADN	Nhận dạng trình tự
hCEACAM1	CEACAM1 ECD (35-428) ở người	NP_001703.2	SEQ ID NO:56
cCEACAM1	CEACAM1 ECD (35-428) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:57
hCEACAM5	CEACAM5 ECD (35-685) ở người	AAA51967.1	SEQ ID NO:58
cCEACAM5	CEACAM5 ECD (35-688) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:59
hCEACAM6	CEACAM6 ECD (35-327) ở người	NP_002474.3	SEQ ID NO:60
cCEACAM6	CEACAM6 ECD (35-327) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:61
hCEACAM8	CEACAM8 ECD (35-332) ở người	NP_001807.2	SEQ ID NO:62
cCEACAM8	CEACAM8 ECD (35-332) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:63
hCEACAM7	CEACAM7 ECD (36-248) ở người	NP_008821.1	SEQ ID NO:64
hCEACAM5 NA1B1	Miền CEACAM5 N-A1-B1 (35-320) ở người	AAA51967.1	SEQ ID NO:65
hCEACAM5 A2B2	Miền CEACAM5 A2-B2 (321-498) ở người	AAA51967.1	SEQ ID NO:66
hCEACAM5 A3B3	Miền CEACAM5 A3-B3 (499-685) ở người	AAA51967.1	SEQ ID NO:67
cCEACAM5 NA1B1	Miền CEACAM5 N-A1-B1 (35-320) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:68
cCEACAM5 A2B2	Miền CEACAM5 A2-B2 (321-498) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:69
cCEACAM5 A3B3	Miền CEACAM5 A3-B3 (499-688) ở khỉ *M.fascicularis*	Tự nhân bản	SEQ ID NO:70

Ví dụ 2: Tạo ra các kháng thể kháng CEACAM5 đơn dòng ở chuột

Trong ví dụ này, các kháng thể đơn dòng đã được tạo ra tiếp sau đó chủng ngừa chuột theo phương thức dẫn đến việc tạo ra mAb kháng CEACAM5.

Ví dụ 2.1: Sự chủng ngừa & sự tạo ra tế bào lai

Các sự chủng ngừa, sự hợp nhất và sàng lọc được thực hiện bằng cách dùng các tế bào tủy P3X63-Ag8.653 với cả hai miền ngoại bào của CEACAM5 ở người, miền ngoại bào của CEACAM5 ở khỉ cynomolgus hoặc với các tế bào UMC11 khối u ở người như được mô tả trong Wennerberg AE et al., 1993. Am. J. Pathol., 143(4), 1050-1054 và Kilpatrick et al. 1997. Hybridoma 16: 381389.

Bằng cách dùng phương pháp RIMMS như được mô tả bởi Kilpatrick et al. (1997 Hybridoma 16: 381389), những con chuột cái BALB/c từ 6 đến 8 tuần

tuổi (S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME) mỗi con đã nhận được bốn vòng chủng ngừa trên một đợt 14 ngày ở các khoảng thời gian từ 3 đến 4 ngày. Các kháng nguyên được nhũ hoá trong tá dược của Titermax (TierMax Gold Adjuvant; Sigma # T2684) đã được tiêm dưới da đến sáu vị trí ở đầu gần với các hạch bạch huyết dẫn lưu, dọc theo lưng của những con chuột này và đến sáu vị trí cạnh nhau dọc bụng. Bốn ngày sau mũi tiêm cuối cùng, những con chuột đã chết để phục vụ nghiên cứu. Vùng kheo hai bên, lỗ bẹn nông, nách và các hạch bạch huyết ở mang đã được cô lập vô trùng và được rửa với môi trường RPMI sạch.

Bằng cách dùng các phương pháp cổ điển như được mô tả bởi Wennerberg AE et al. (1993. Am. J. Pathol, 143 (4), 1050-1054), những con chuột cái BALB/c từ 6 đến 8 tuần tuổi (S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME), mỗi con đã nhận được ba vòng chủng ngừa trên một đợt 41 ngày. Các kháng nguyên được tiêm trong màng bụng đến vị trí ở bụng của những con chuột. Ba ngày sau mũi tiêm cuối cùng, những con chuột đã chết để phục vụ nghiên cứu và các lá lách được cô lập vô trùng và được rửa với môi trường RPMI sạch.

Các tế bào lympho đã được tách ra từ các hạch bạch huyết hoặc từ các lá lách và huyền phù đơn bào được rửa hai lần với môi trường RPMI trước khi được hợp nhất với các tế bào u tủy P3X63-AG8.653 bằng cách dùng polyetylen glycol. Sau khi hợp nhất, hỗn hợp tế bào được ủ trong lồng ấp ở 37°C trong khoảng thời gian từ 16 đến 24 giờ. Các tế bào bào chế thu được được chuyển vào môi trường bán rắn chọn lọc và được tạo hình đĩa vô trùng thành các đĩa Petri 100 mm và ủ ở 37°C. Mười ngày sau khi bắt đầu chọn lọc, các đĩa này được kiểm tra sự phát triển tế bào lai, và các cụm khuẩn có thể nhìn thấy được vớt lên và đặt vào đĩa 96 giếng có chứa 200 µl môi trường phát triển. 96 đĩa giếng này được giữ trong lồng ấp ở 37°C trong khoảng thời gian từ 2 đến 4 ngày.

Ví dụ 2.2: Sàng lọc và mô tả đặc tính in vitro của các kháng thể kháng CEACAM5 ở chuột

Sàng lọc đầu tiên đối với việc sản xuất IgG kháng CEACAM5 được thực hiện bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) bằng cách dùng protein CEACAM5 ở người (được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 1) làm kháng nguyên bắt và bằng FACS bằng cách dùng một số tế bào khối u ở người (H460, MKN45, SW1463, SKMEL28 và UMC11). Đối với thử nghiệm ELISA, các đĩa được phủ với protein CEACAM5 ở người ở mức 0,25 µg/giếng trong PBS và 100 µL/giếng của các kháng thể kháng CEACAM5 đã được bổ sung vào đĩa này. Đĩa này được ủ ở 37°C trong 1 giờ và rửa năm lần với PBS chứa 0,05% Tween-20 (PBS-T). Sau đó, 100 µL dung dịch loãng với tỷ lệ 1:50.000 của IgG kháng chuột ở thỏ liên hợp với peroxidaza cải ngựa (Sigma; #A9044) được thêm vào mỗi giếng. Sau khi ủ ở 37°C trong 1 giờ trong bóng tối, các đĩa được rửa năm lần với PBS-T. Liên kết kháng thể có thể thấy được bằng cách thêm dung dịch đệm TMB-H_2O_2 và đọc ở bước sóng 450 nm. Đối với thử nghiệm FACS, các tế bào khối u ở người được phủ ở mức 40.000 tế bào/giếng trên đĩa High Bind 96 giếng (MSD L15XB-3) và 100 µL/giếng của các kháng thể kháng CEACAM5 đã được thêm vào trong khoảng thời gian 45 phút ở nhiệt độ 4°C và rửa ba lần với PBS 1% BSA. 100 µL/giếng của IgG kháng chuột ở dê liên hợp với Alexa647 (Invitrogen; #A2135) đã được thêm vào trong khoảng thời gian 45 phút ở nhiệt độ 4°C và rửa ba lần với PBS 1% BSA. Liên kết kháng thể được đánh giá sau khi ly tâm và pha loãng lại các tế bào bằng cách thêm PBS 1% BSA với lượng 200 µL/giếng và đọc bằng cách sử dụng Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System.

Để đánh giá độ đặc hiệu đối với CEACAM5 của các kháng thể kháng CEACAM5, đĩa 96 giếng được phủ với các protein CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 và CEACAM8 tái tổ hợp ở người (được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 1) bằng cách sử dụng các điều kiện phủ tương tự như được mô tả trước đây. Các kháng thể kháng CEACAM5 được thêm vào các đĩa và được phát hiện bằng cách dùng IgG kháng chuột ở thỏ liên hợp với peroxidaza cải ngựa (Sigma; #A9044). Liên kết kháng thể có thể thấy được bằng cách thêm dung dịch đệm TMB-H_2O_2 và đọc ở bước sóng 450 nm. Các kết quả được trình

bày trên Hình 1 cho thấy các kháng thể kháng CEACAM5 là có chọn lọc đối với CEACAM5 ở người, CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 và CEACAM8 ở người.

Ví dụ 2.3: đặc tính liên kết mAb

Ái lực biểu kiến của các kháng thể kháng CEACAM5 với hCEACAM5 biểu hiện trên bề mặt của các tế bào khối u MKN45 (DSMZ, ACC 409) ở người được xác định bằng Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System. Các tế bào khối u MKN45 được phủ ở mức 40.000 tế bào/đĩa trên đĩa High Bind 96 giếng (MSD L15XB-3) và 100 µL/giếng của các kháng thể kháng CEACAM5 được thêm vào các dung dịch pha loãng 2 lần liên tiếp bắt đầu ở 20 µ g/ml cho đến 12 dung dịch pha loãng trong thử nghiệm chất pha loãng trong 45 phút ở 4°C và rửa ba lần với PBS 1% BSA. 100 µL/giếng của IgG kháng chuột ở dê liên hợp với Alexa647 (Invitrogen; #A2135) được thêm vào trong 45 phút ở 4°C và rửa ba lần với PBS 1% BSA. Liên kết kháng thể được đánh giá sau khi ly tâm và pha loãng lại các tế bào bằng cách thêm PBS 1% BSA với lượng 200 µL/giếng và đọc bằng cách sử dụng Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System. Các giá trị KD và EC50 biểu kiến được ước tính bằng cách sử dụng các phần mềm BIOST@T-BINDING và BIOST@T-SPEED, tương ứng.

Bảng 2: Các giá trị EC50 thu được trên các tế bào MKN45

Các kháng thể	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
Các giá trị EC50	16 nM	3,4 nM	6,2 nM	4,9 nM	0,73 nM

Lậpbản đồ miền của các kháng thể kháng CEACAM5 đối với các protein CEACAM5 ở người và CEACAM5 ở khỉ cynomolgus được xác định bằng phương pháp ELISA. Đĩa 96 giếng được phủ với các miền tái tổ hợp A1 (143-237), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) và A3-B3 (499-685) ở người của protein CEACAM5 (được bào chế như được mô tả trong ví dụ 1) và với các miền N-A1-B1 (1-320), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) và A3-B3 (499-688) tái tổ hợp ở khỉ cynomolgus của protein CEACAM5 (được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 1) bằng cách sử dụng các điều kiện phủ tương tự như

được mô tả trước đây. Các kháng thể tinh khiết được thêm vào các đĩa và được phát hiện bằng cách dùng IgG kháng chuột ở thỏ liên hợp với peroxidaza cải ngựa (Sigma; #A9044). Liên kết kháng thể có thể thấy được bằng cách thêm dung dịch đệm TMB-H_2O_2 và đọc ở bước sóng 450 nm. Các kết quả được trình bày trên hình 2 và 3 cho thấy rằng các kháng thể kháng CEACAM5 liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và khỉ cynomolgus.

Các dạng đồng nhất của các mAb riêng lẻ được xác định bằng cách dùng bộ kit định dạng IgG ở chuột theo hướng dẫn của nhà sản xuất (SEROTEC ref. MMT1). Năm mAb CEACAM5 đặc hiệu là của IgG1, dạng đồng nhất k.

Ví dụ 3: Mô tả đặc tính của các kháng thể kháng CEACAM5 ở chuột

Ví dụ 3.1: Mô tả đặc tính in vitro của các kháng thể kháng CEACAM5 ở chuột

Tế bào lai chuột biểu hiện các kháng thể CEACAM5 đặc hiệu được tạo ra vào bình T500 và môi trường điều hoà được thu gom sau 7 ngày phát triển. Các kháng thể CEACAM5 đặc hiệu được tinh chế bằng cách cho đi qua môi trường điều hòa qua cột protein-G, được rửa và rửa giải với dung dịch đệm Glyxin/HCI 100mM có độ pH 2,7. Nước giải hấp được thẩm tách với PBS trước khi lọc vô trùng và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Tất cả các mAb CEACAM5 đặc hiệu được đánh giá về khả năng liên kết với protein CEACAM5 ở người và động vật linh trưởng của chúng bằng phương pháp ELISA. Các đĩa được phủ với protein CEACAM5 ở người hoặc động vật linh trưởng, các mAb kháng hCEACAM5 được thêm vào đĩa và được phát hiện với IgG kháng chuột ở thỏ liên hợp với peroxidaza cải ngựa (Sigma; #A9044). Liên kết kháng thể có thể thấy được bằng cách thêm dung dịch đệm TMB-H_2O_2 và đọc ở bước sóng 450 nm.

Bảng 3: Các giá trị EC50 tương ứng với khả năng liên kết của các mAb CEACAM5 đặc hiệu với các protein CEACAM5 ở động vật linh trưởng

Các kháng thể	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
EC50 (nM) hCEACAM5	0,53	0,14	0,36	0,08	0,40
EC50 (nM) cCEACAM5	1,18	0,07	3,72	0,05	0,45
Tỷ lệ c/h	2,2	0,5	10	0,6	1,1

Ví dụ 3.2: Ai lực biểu kiến và khả năng liên kết kháng thể của các kháng thể kháng CEACAM5 với các tế bào khối u đại tràng nguyên phát tiên tiến ở người CR-IGR-034P bằng Flow Cytometry

Khối u đại tràng nguyên phát tiên tiến ở người CR-IGR-034P (Julien et al., Clin Cancer Res 01 tháng 10 2012 18:5314-5328) thu được từ ghép ngoại lai có nguồn gốc từ chuột. Khối u CR-IGR-034P được phân tách enzym bằng cách sử dụng colagenaza Type IV (Invitrogen; #17104-019) và deoxyribonucleaza I (Invitrogen; # 18047-019) trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Khả năng tồn tại của tế bào được ước tính bằng ứng dụng Viacount bằng cách sử dụng Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System. Để ước tính ái lực biểu kiến, các tế bào khối u CR-IGR-034P được phủ ở mức 40.000 tế bào/đĩa trên đĩa High Bind 96 giếng (MSD L15XB-3) và 100 µL/giếng của các kháng thể kháng CEACAM5 đã được thêm vào các dung dịch pha loãng 2 lần liên tiếp tiếp bắt đầu ở 20 µg/ml lên đến 12 dung dịch pha loãng trong thử nghiệm pha loãng trong khoảng thời gian 45 phút ở nhiệt độ 4°C và rửa ba lần với PBS 1% BSA. 100 µL/giếng của IgG kháng chuột ở dê liên hợp với Alexa647 (Invitrogen; #A2135) hoặc IgG kháng nhân ở dê liên hợp với Alexa488 (Invitrogen; #A11013) được thêm vào trong khoảng thời gian 45 phút ở nhiệt độ 4°C và rửa ba lần với PBS 1% BSA. Liên kết kháng thể được đánh giá sau khi ly tâm và pha loãng lại các tế bào bằng cách thêm PBS 1% BSA với lượng 200 µL/giếng và đọc bằng cách sử dụng Guava® easyCyte™ 8HT Flow Cytometry System. Các giá trị KD và EC50 biểu kiến được ước tính bằng cách dùng các phần mềm BIOST@T-BINDING và BIOST@T-SPEED tương ứng.

Khả năng liên kết kháng thể của các kháng thể kháng CEACAM5 được xác định bằng cách dùng bộ kit Mouse IgG Calibrator (Biocytex #7208) hoặc bộ kit Human IgG Calibrator (Biocytex #CP010) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 4: Các giá trị biểu kiến KD và EC50 thu được trên các tế bào khối u đại tràng nguyên phát tiên tiến ở ngườiCR-IGR-034P

Các kháng thể	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
Giá trị KD	1,92 nM	0,38 nM	1,01 nM	0,16 nM	0,5 nM
Giá trị EC50	1 nM	0,53 nM	2,8 nM	0,2 nM	1,4 nM

Ví dụ 3.3: Hoạt tính tiếp thu của các kháng thể CEACAM5 đặc hiệu ở chuột

Để đánh giá sự tiếp thu của các kháng thể kháng CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5, các tế bào MKN45 có thể tồn tại được được ủ trong khoảng thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO_2 5% (hoặc ở nhiệt độ 4°C trên đá để giữ lạnh) với 10 µg/ml các kháng thể kháng CEACAM5 được dán nhãn trước bằng AlexaFluor488. Sau đó, một phần của các giếng này được rửa với môi trường nuôi cấy và các kháng thể được dán nhãn AF ngoại bào liên kết với các tế bào này bị dập tắt bằng cách ủ các tế bào này với kháng thể kháng AlexaFluor488 (50 g/ml) vào đá trong khoảng thời gian 30 phút (mức phát huỳnh quang nội bào). Phần khác của các giếng chỉ được ủ với môi trường nuôi cấy trong cùng điều kiện thời gian (mức phát huỳnh quang tổng).

Sau đó, các tế bào này được tách ra và rửa, và thu gom trong môi trường nuôi cấy trước khi phân tích tế bào học dòng chảy bằng cách sử dụng máy phân tích MACSQUANT Vyb. Sự phát huỳnh quang liên kết tế bào của các tế bào 1 x 10^4 được đo, và cường độ huỳnh quang trung bình của các tế bào có thể sống được qua cửa được định lượng. Tỷ lệ tiếp thu (%) được xác định bằng cách chia mức phát huỳnh quang liên kết tế bào bị dập tắt cho mức phát huỳnh quang liên kết tế bào tổng nhân với 100. Dữ liệu được biểu thị là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD)

Bảng 5: Sự tiếp thu kháng thể Kháng CEACAM5 ở chuột trong khoảng thời gian 24 giờ ở dòng tế bào MKN45

Kháng thể	Sự tiếp thu trong khoảng thời gian 24 giờ, ở nhiệt độ 37°C/CO_2 5% % ± StD
MAb1	49,9 ± 5,1
MAb2	45,0 ± 5,5
MAb3	51,1 ± 3,5
MAb4	42,5 ± 6,7
MAb5	51,7 ± 3,1

Năm kháng thể CEACAM5 đặc hiệu trải qua sự tiếp thu sau khi liên kết của CEACAM5 được biểu hiện ở màng bề mặt tế bào, hỗ trợ ứng dụng của chúng trong lĩnh vực kháng thể liên hợp miễn dịch với địa chỉ cụ thể gây độc tế bào với các tế bào ung thư. Các kháng thể kháng CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 và MAb5 cho thấy sự tiếp thu ở các dòng tế bào ung thư ở người MKN45 tương ứng là 49,9%, 45%, 51,1%, 42,5%, 51,7%, sau khi ủ trong khoảng thời gian 24 giờ.

Ví dụ 3.4: Hoạt tính gây độc tế bào của ADCs ở chuột tương ứng ở dòng tế bào MKN45

Các kháng thể ở chuột được liên hợp để xác định hoạt tính gây độc tế bào của chúng in vitro. Trong ống 15 ml, ở nhiệt độ phòng (23°C), mAb, dung dịch đệm A/HEPES (4%), DMA (dimetylaxetamit, 20% theo thể tích), sau đó 6 đương lượng chất liên kết SPDB được đưa vào liên tục dưới khuấy từ. Sau một đêm ở nhiệt độ phòng, DM4 (tác nhân gây độc tế bào, 9,6 đương lượng) trong dung dịch 15 mM DMA được thêm vào, và phản ứng trong 5 giờ. Hỗn hợp liên hợp thô được tinh chế trên Superdex 200pg 16/60 cột hoặc G25 26/10 cột (PBS-Na độ pH 7,4/NMP 5%), được cô đặc trên Amicon 15 @ 5000g và được lọc trên Millex 0,22µm.

Hiệu quả của các liên hợp tác nhân gây độc tế bào. kháng CEACAM5 sau đó đã được thử nghiệm trên khả năng tồn tại của tế bào khối u bằng cách dùng bộ kit Cell Titer-Glo (Promega). Để làm như vậy, các tế bào ung thư dạ dày MKN45 ở người được cấy trong đĩa 96 giếng và được tuân thủ trong khoảng

thời gian 4 giờ trong môi trường nhiệt độ 37°C/CO_2 5%. Các nồng độ khác nhau của các liên hợp kháng CEACAM5 được thêm vào các tế bào hạt giống. Các tế bào này sau đó được ủ trong khoảng thời gian 96 giờ trong môi trường tương tự. Sau đó, thuốc thử Cell Titer-Glo được thêm vào các giếng trong khoảng thời gian 10 phút ở nhiệt độ phòng và tín hiệu phát quang được đo bằng cách dùng bộ đếm đĩa EnVision (Perkin-Elmer).

Bảng 6: Các hoạt tính gây độc tế bào của các ADC CEACAM5 đặc hiệu ở chuột ở dòng tế bào CEACAM5 + MKN45

Liên hợp thuốc kháng thể	Hoạt tính gây độc tế bào IC_{50} (nM)
MAb1-SPDB-DM4	0,89 ± 0,23
MAb2-SPDB-DM4	0,14 ± 0,01
MAb3-SPDB-DM4	0,53 ± 0,15
MAb4-SPDB-DM4	0,96 ± 0,02
MAb5-SPDB-DM4	0,24 ± 0,04

Các kháng thể kháng CEACAM5 liên hợp với tác nhân gây độc tế bào (DM4) MAb1-SPDB-DM4, MAb2-SPDB-DM4, MAb3-SPDB-DM4, MAb4-SPDB-DM4 và MAb5-SPDB-DM4 cho thấy các hoạt tính gây độc tế bào in vitro với IC50 tương ứng là 0,89, 0,14, 0,53, 0,96 và 0,24 nM.

Ví dụ 4: Xác định trình tự của các chuỗi nặng và nhẹ của các mAb kháng CEACAM5

Các trình tự của các miền biến đổi của mAb được lấy từ tế bào lai và được nhân bản vô tính thành vật chủ trung gian biểu hiện để đảm bảo rằng các mAb được nhân bản vô tính có các đặc tính tương tự với các mAb ở chuột ban đầu.

Các trình tự axit amin dẫn xuất cung cấp thông tin phù hợp với dữ liệu thu được trên các mAb tinh khiết có nguồn gốc từ tế bào lai bằng cách sắp xếp theo trình tự N đầu cuối và trắc khối phổ (LC/MS) của các chuỗi nặng và nhẹ (LC, HC) (xem Bảng 7).

Bảng 7: Phân tích trắc khối phổ của các mAb kháng CEACAM5 từ tế bào lai

		Khối lượng (Da)	
ID nhân bản	Chuỗi	Bằng LC/MS từ mẻ	Giá trị *in silico* Trình tự thu được
MAb1	LC	23837	23836
	HC (G0F)	50328	50330
MAb2i*	LC	23467	23467
	HC (G0F)	50288	50286
MAb3	LC	23907	23907
	HC (G0F)	50372	50373
MAb4	LC	23731	23731
	HC (G0F)	50370	50370
MAb5	LC	23659	23659
	HC (G0F)	50329	50330

*: MAb2i là kháng thể được tạo ra bằng một trong số các tế bào lai và từ đó còn được gọi là "MAb2" đã được bắt nguồn bằng cách đưa các gốc chính tắc vào các vùng khung VL và VH, như được giải thích trong ví dụ 5.

Ví dụ 5: Liên hợp thuốc kháng thể (ADC) (thể khảm)

Ví dụ 5.1: mAb thể khảm trần

Các trình tự axit nucleic của các miền biến đổi VH, VL được nhân bản vô tính thành vật chủ trung gian biểu hiện hợp nhất với IgG1 ở người hoặc các trình tự mã hoá miền không đổi Ckappa ở người tương ứng để sau đó tạo ra các mẻ của các mAb thể khảm bằng sự biểu hiện thoáng qua ở HEK293 như được mô tả trong Ví dụ 1. Các ai lực với CEACAM5 ở người và ở khỉ cynomolgus vẫn tương tự đối với các mAb ở chuột và ở thể khảm. Trên Bảng 8, các ái lực được minh họa bằng các EC50 thu được bằng phương pháp ELISA với CEACAM5 ở người hoặc ở khỉ cynomolgus.

Bảng 8: EC50 thu được với CEACAM5 đối với tế bào lai ở chuột và các mAb thể khảm tương ứng

EC50 thu được đối với các mAb tế bào lai ở chuột			EC50 thu được đối với các mAb thể khảm		
ID nhân bản	hCEACAM5	cCEACAM5	ID nhân bản	hCEACAM5	cCEACAM5
MAb1	0,53	1,18	chMAb1	0,51	1,57
MAb2i	0,14	0,07	chMAb2 (lô 1)	0,16	0,13
			chMAb2 (lô 2)	0,14	0,17
			$chMab2_{K52R}$	0,11	0,15
MAb3	0,36	3,72	ch MAb3	chưa xong	chưa xong
MAb4	0,08	0,05	ch MAb4	0,14	0,12
MAb5	0,4	0,45	ch MAb5	0,18	0,13

Các trình tự đối với các vùng CDR được suy ra từ trình tự protein bằng cách dùng danh pháp IMGT. Chúng tương ứng với SEQ ID NO:1-4, 6, 7-10, 12, 13-16, 18, 19-22, 24, 25-28, 30.

Lưu ý, so với kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai nhân bản vô tính (MAb2i), các gốc chính tắc đã được đưa vào MAb2 nhân bản tại các vị trí 41G, 42K, và 45Q trên VL, và tại các vị trí 5Q và 7S trên VH.

Ngoài ra, lysin ở vị trí 52 trên VL của MAb2 CEA-4 nhân bản được định vị trong CDR2, đã được thay thế bằng arginin trong $Mab2_{K52R}$ nhân bản. Một mẻ được tạo ra trong các điều kiện tương tự mà tương ứng với MAb2 nhân bản và dẫn đến ái lực tương tự với các miền ngoại bào CEACAM5 ở người và ở khỉ như được thể hiện trên Bảng 7. Nó nhấn mạnh rằng đột biến này trong CDR có thể được thực hiện mà không ảnh hưởng đến liên kết.

Các trình tự LC và HC của mAb thể khảm đối với MAb2 nhân bản và $Mab2_{K52R}$ nhân bản tương ứng với SEQ ID NO:43, 44, 54.

chMAb2 được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 4. Nó là mAb thể khảm bắt nguồn từ MAb2 nhân bản với IgG1, dạng tương tự Ck. Các trình tự tương ứng với SEQ ID NO:43, và 44. Một mẻ đã được tạo ra ở quy mô 300 mg bằng sự biểu hiện thoáng qua trong HEK293 tiếp theo bằng việc tính chế sắc ký ái lực protein, xem Bảng 7 đối với dữ liệu liên kết. Đó là mAb trần được dùng cho việc tạo ra ADC.

Ví dụ 5.2: Việc tạo ra và mô tả đặc tính của ADC

Trong ví dụ này, cacs thể liên hợp miễn dịch được bào chế từ mAb thể khảm trần. Sau đó, tính hiệu quả in vivo được đánh giá.

Tính toán DAR:

Thể liên hợp thường gao gồm từ 1 đến 10 phân tử của tác nhân gây độc tế bào được công hóa trị với kháng thể (còn được gọi là, tỷ lệ "thuốc với kháng thể" hoặc "DAR"). Con số này có thể thay đổi theo tính chất của kháng thể và tác nhân gây độc tế bào được sử dụng cùng với các điều kiện thực nghiệm được dùng cho sự liên hợp này (như tỷ lệ tác nhân gây độc tế bào/kháng thể, thời gian phản ứng, tính chất của dung môi và đồng dung môi nếu có). Vì vậy, sự tiếp xúc giữa kháng thể và tác nhân gây độc tế bào dẫn đến hỗn hợp bao gồm một vài thể liên hợp khác nhau bởi các tỉ lệ thuốc với kháng thể khác nhau; kháng thể trần tùy ý; các tổ hợp tùy ý. Vì thế, DAR được xác định là giá trị trung bình.

Phương pháp được dùng trong tài liệu này để xác định DAR cốt ở việc đo quang phổ kế tỷ lệ hấp thụ ở 252 nm và 280 nm của dung dịch của thể liên hợp về cơ bản là tinh khiết. Cụ thể là, DAR đã nêu có thể được xác định quang phổ kế bằng cách sử dụng các hệ số dập tắt đo được tương ứng ở 280 và 252 nm đối với kháng thể và đối với tác nhân gây độc tế bào (ε_{D280} = 5,180 $M^{-1}cm^{-1}$ và ε_{D252} = 26,159 $M^{-1}cm^{-1}$). Phương pháp tính lấy được từ Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol 525, 445, Springer Science và được mô tả chi tiết hơn dưới đây:

Các độ hấp thụ đối với thể liên hợp ở 252 nm (A252) và ở 280 nm (A280) được đo hoặc trên đỉnh đơn phân của phân tích sắc ký loại trừ kích thước (SEC) (cho phép tính toán tham số "DAR(SEC)") hoặc bằng cách sử dụng máy quang phổ kế cổ điển (cho phép tính toán tham số "DAR(UV)"). Các độ hấp thụ này có thể được biểu diễn như sau:

$A_{252} = (C_D \times \varepsilon_{D252}) + (C_A \times \varepsilon_{A252})$

$A_{280} = (C_D \times \varepsilon_{D280}) + (C_A \times \varepsilon_{A280})$

trong đó:

• C_D và C_A tương ứng là các nồng độ trong dung dịch của tác nhân gây độc tế bào và kháng thể.

• ε_{D252} và ε_{D280} tương ứng là các hệ số dập tắ mol của tác nhân gây độc tế bào ở 252 nm và 280 nm

• ε_{A252} và ε_{A280} tương ứng là các hệ số dập tắt mol của kháng thể ở 252 nm và 280 nm.

Giải hai phương trình này với hai ẩn số dẫn đến các phương trình sau đây:

$C_D = [(\varepsilon_{A280} \text{ X } A_{252}) - (\varepsilon_{A252} \text{ X } A_{280})] / [(\varepsilon_{D252} \text{ X } \varepsilon_{A280}) - (\varepsilon_{A252} \text{ X } \varepsilon_{D280})]$

$C_A = [A_{280} - (C_D \text{ X } \varepsilon_{D280})] / \varepsilon_{A280}$

Sau đó, DAR trung bình được tính toán từ tỷ lệ của nồng độ thuốc với nồng độ của kháng thể: $DAR = C_D / C_A$

Sự khử glycosyl hoá và đo khối phổ độ phân giải cao của các thể liên hợp (HRMS)

Sự khử glycosyl hoá là kỹ thuật tiêu hóa enzym bằng phương tiện glycosidaza. Sự khử glycosyl hoá được làm từ 500 µl của thể liên hợp + 100 µl của dung dịch đệm Tris HCl 50 mM + 10 µl của enzym glycanaza-F (100 đơn vị enzym đông khô/100 µl nước). Môi trường được tạo xoáy và được duy trì một đêm ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, mẫu được khử glycosyl hóa này sẵn sàng để được phân tích trong HRMS. Khối phổ thu được trên hệ thống Waters Q-Tof-2 ở chế độ phun điện dương (ES+).

Các điều kiện sắc ký là như sau: cột: 4 µm BioSuite 250 URH SEC 4,6x300 mm (Waters); các dung môi: A: amoni focmat 25 mM + axit focmic 1%: B: CH_3CN; nhiệt độ cột: 30°C; lưu lượng 0,4 ml/phút; rửa giải đẳng cấp 70% A + 30% B (15 phút).

Sắc ký loại trừ kích thước phân tích(SEC)

- Cột: cột TSKgel G3000 SWXL 5µm, 7,8 mm x 30 cm, TOSOH BIOSCIENCE, LLC Part # 08541 + cột bảo vệ TSK-GEL SWXL 7 µM, 40 mm x 6mm, TOSOH BIOSCIENCE, LLC Part # 08543

- Pha di động: KCI (0,2M), KH_2PO_4 (0,052 M), K_2HPO_4 (0,107 M), iPrOH (20% về thể tích)

- Các điều kiện phân tích: rửa giải đẳng cấp ở mức 0,5 ml/phút trong 30 phút

- Phân tích thực hiện trên hệ thống Lachrom Elite HPLC (Merck) bằng cách sử dụng đầu dò quang phổ L2455 DAD.

Hàm lượng của các dung dịch đệm

- Dung dịch đệm A (độ pH 6,5): Nacl (50 mM), dung dịch đệm Kali Phosphat (50 mM), EDTA (2 mM)

- Dung dịch đệm HGS (độ pH 5,5): histidin (10 mM), glyxin glyxin (130 mM), sucroza sucroza 5% (về thể tích), HCl (8 mM)

Các chữ viết tắt được dùng

CV: Thể tích; DAR: Tỷ lệ thuốc kháng thể; DMA: dimetylaxetamit; HEPES: 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazin-axit etansulfonic; HRMS: Khối phổ độ phân giải cao; NHS: N-hydroxysucxinimit; Nitro-SPDB: axit butanoic, 4-[(5-nitro-2-pyridinyl)dithio]-, 2,5-dioxo-1–este pyrolidinyl (có thể được bào chế như mô tả trong bằng sáng chế WO2004016801); NMP: N-metylpyrolidinon; RT: nhiệt độ phòng; SEC: sắc ký loại trừ kích thước

ADC (các thể khảm):

chMAb1 -SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 148438 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 213320; ε_{252nm} (Ab) = 73473

ε_{280nm} (DM4) = 5180 và ε_{252nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,59 ml chMAb1 (C = 5,72 mg/ml trong dung dịch đệm PBS pH = 7,4) được đưa vào trong bình, tiếp theo là 0,312 ml DMA và 0,046 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5,0 Eq - 15mM dung dịch trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Dưới khuấy từ, 3,8 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,389 ml DMA và 0,074 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 2,5 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế trên cột khử muối HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV của dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP về thể tích. Thể liên hợp được rửa giải với dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp

lại, cô đặc trên Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) và được lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, 7,6 ml thể liên hợp chMAb1-SPDB-DM4 (c = 2,19 mg/ml) thu được là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp này được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,38; DAR (SEC) = 3,34; RT = 17,54 phút; độ tinh khiết đơn phân = 99,8%.

Kết quả phân tích HRMS được thể hiện trên Hình 8.

chMAb2-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab).= 147900 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 201,400; ε_{252nm} (Ab) = 70889

ε_{280nm} (DM4) = 5180 và ε_{252nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,8 ml chMAb2 (C = 5,08 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,337 ml DMA và 0,0433 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5,0 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó được khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Dưới khuấy từ, 3,12 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,319 ml DMA và 0,069 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 2 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được lọc trên bộ lọc 0,45 µm lọc và được tinh chế trên cột khử muối HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1M, 2 CV nước và 2 CV của dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP về thể tích. Thể liên hợp được rửa giải với dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại, được cô đặc trên Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) và được lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, 7,5 ml thể liên hợp chMAb2-SPDB-DM4 (c = 1,8 mg/ml) thu được là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 4,10; DAR (SEC) = 4,05; RT = 17,52 phút; độ tinh khiết đơn phân = 99,9%.

Kết quả phân tích HRMS được hiển thị trên Hình 9.

chMAb4-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 148124 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} 280nm (Ab) = 204380; ε_{280nm} 252nm (Ab) = 73142

ε_{280nm} 280nm (DM4) = 5180 và ε_{280nm} 252nm (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,63 ml chMAb4 (C = 5,69 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,316 ml DMA và 0,0465 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5,0 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Dưới khuấy từ, 3,8 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,389 ml DMA và 0,074 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 2 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế trên cột khử muối HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV của dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP về thể tích. Thể liên hợp được rửa giải với dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại, được cô đặc trên Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) và được lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, 6,5 ml thể liên hợp chMAb4-SPDB-DM4 (c = 2,20 mg/ml) thu được là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,87; DAR (SEC) = 3,85; RT = 17,52 phút; độ tinh khiết đơn phân = 99,8%.

Kết quả phân tích HRMS được hiển thị trên Hình 10.

chMAb5-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 148040 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} 280nm (Ab) = 207360; ε_{280nm} 252nm (Ab) = 72288

ε_{280nm} 280nm (DM4) = 5180 và ε_{280nm} 252nm (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,15 ml chMAb5 (C = 6,38 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,269 ml DMA và

0,0453 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5,0 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Dưới khuấy từ, 4,1 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,317 ml DMA và 0,072 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục.Sau 2 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được lọc trên bộ lọc 0,45 µm và được tinh chế trên cột khử muối HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV của dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP về thể tích. Thể liên hợp được rửa giải với dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 chứa 5% NMP, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại, được cô đặc trên Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) và được lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, 7,5 ml thể liên hợp kháng CEACAM5_hyb_1917CEA4_VH5Q7S_VL41G42K45Q_IgG1-SPDB-DM4 (c = 3,4 mg/ml) thu được là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp này được được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,4; DAR (SEC) = 3,4; RT = 17,49 min; độ tinh khiết đơn phân = 99,8%.

Kết quả phân tích HRMS được thể hiện trên Hình 11.

Ví dụ 5.3: Tính hiệu quả in vivo

Bốn thể liên hợp thể khảm (chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 và chMAb2-SPDB-DM4) được đánh giá ở 2 liều chống lại các khối u đại tràng nguyên phát có thể đo được CR-IGR-034P được cấy ghép tự nhân bản ở những con chuột cái SCID. Các nhóm đối chứng không được điều trị. Các liều của các thể liên hợp được cho bằng mg/kg. Chúng được dùng ở 5 và 2,5 bằng mũi tiêm bolus tĩnh mạch (IV), vào ngày 14 sau khi cấy ghép khối u.

Để đánh giá các hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp, các động vật được cân hàng ngày và các khối u được đo 2 lần mỗi tuần bằng thước cặp. Một liều lượng tạo ra sự giảm 20% trọng lượng tại điểm thấp nhất (trung bình của nhóm) hoặc 10% hoặc chết do nhiều thuốc hơn, được coi là liều lượng quá mức

độc hại. Trọng lượng cơ thể động vật kể cả trọng lượng khối u. Thể tích khối u được tính toán bằng cách sử dụng công thức (mm^3) = [chiều dài (mm) x chiều rộng (mm)2]/2. Các điểm cuối hiệu quả chính là ΔT/ΔC, phần trăm sự thoái hoá trung bình, các sự thoái hoá một phần và hoàn toàn (PR và CR).

Những thay đổi về thể tích khối u đối với mỗi nhóm được điều trị (T) và nhóm đối chứng (C) được tính toán đối với mỗi khối u bằng cách trừ thể tích khối u ở ngày đầu tiên điều trị (dàn ngày) cho thể tích khối u ở ngày quan sát được chỉ định. ΔT trung bình được tính cho nhóm được điều trị và ΔC trung bình được tính cho nhóm đối chứng. Sau đó, tỷ lệ ΔT/ΔC được tính toán và được thể hiện như là tỷ lệ phần trăm: ΔT/ΔC = (delta T/delta C) x 100.

Liều được coi là có hiệu quả trị liệu khi tỉ số ΔT/ΔC thấp hơn 40% và rất hiệu quả khi ΔT/ΔC thấp hơn 10%. Nếu ΔT/ΔC thấp hơn 0, liều này được coi là có hiệu quả cao và tỷ lệ phần trăm của sự thoái hoá đã đạt đến độ giới hạn (Plowman J, Dykes DJ, Hollingshead M, Simpson-Herren L and Alley MC. Human tumor xenograft models in NCL drug development. In: Feibig HH BA, editor. Basel: Karger.; 1999 p 101 -125):

% sự thoái hoá khối u được định nghĩa là% sự giảm thể tích trong nhóm được điều trị ở ngày theo dõi cụ thể so với thể tích của nó vào ngày điều trị đầu tiên.

Tại một thời điểm cụ thể và đối với mỗi động vật, % sự suy thoái được tính toán. Sau đó, % sự thoái hoá trung bình được tính toán cho nhóm:

$$\%\ \text{sự thoái hoá (tại thời điểm t)} = \frac{\text{Thể tích ở thời điểm t0} - \text{Thể tích ở thời điểm t}}{\text{Thể tích ở thời điểm t0}} \times 100$$

Sự thoái hoá từng phần (PR): các sự thoái hoá được xác định là một phần nếu thể tích khối u giảm tới 50% thể tích khối u ở thời điểm bắt đầu điều trị.

Sự thoái hoá hoàn toàn (CR): Sự thoái hoá hoàn toàn đạt được khi thể tích khối u = 0 mm^3 (CR được quan tâm khi thể tích khối u không thể được ghi lại).

Kết quả

Các kết quả được trình bày trên Hình 4 và Bảng 9 (bên dưới). Bằng cách dùng một lịch trình điều trị duy nhất là 2,5 và 5 mg/kg, toàn bộ các thể liên hợp được thử nghiệm trong nghiên cứu này đã không gây ra độc tính.

chMAb1-SPDB-DM4 là rất có hiệu quả ở mức 5 và 2,5 mg/kg với ΔT/ΔC tương ứng bằng 0 và 7% ($p < 0,0001$ và $p = 0,0170$ so với đối chứng). chMAb4-SPDB-DM4 và chMAb5-SPDB-DM4 có hiệu quả cao ở mức 5 mg/kg với ΔT/ΔC tương ứng bằng -5 và -7% ($p < 0,0001$ so với đối chứng), và sự thoái hoá khối u tương ứng bằng 25 và 65%. Chúng rất có hiệu quả ở mức 2,5 mg/kg với tỉ lệ ΔT/AC tương ứng bằng 7 và 2% ($p = 0,0152$ và $p = 0,0020$ so với đối chứng). chMAb2-SPDB-DM4 có hiệu quả cao ở mức 5 và 2,5 mg/kg với ΔT/ΔC tương ứng bằng -10 và -8% ($p < 0,0001$ so với đối chứng), sự thoái hoá khối u tương ứng bằng 82 và 39%, và 3 và 1 CR/6, tương ứng.

Từ những kết quả này, tất cả các thể liên hợp thể khảm chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 và chMAb2-SPDB-DM4 là có thể dùng được để phát triển ADC trị liệu.

Bảng 9: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4, và chMAb5-SPDB-DM4 chống lại ung thư ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở những con chuột cái SCI D.

Tác nhân[1]	Đường dùng/ Liều lượng theo mL/kg	Đường dùng/ theo mL/kg mỗi mũi tiêm	Lịch tiêm theo các ngày	Chết do thuốc (ngày)	Sự thay đổi trọng lượng cơ thể trung bình theo % ở mỗi con chuột ở điểm đáy (ngày của điểm đáy)	Trung bình ΔT/ΔC theo % (ngày)	Trung bình theo % của sự thoái hoá (ngày)	Sự thoái hoá		Thống kê sinh học Giá trị p[2]	Lời chú thích
								Một phần	Hoàn toàn.		
chMAb1-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	5	14	0/6	-0,3 (D23)	0 (D33)	-	2/6	0/6	<0,0001	Rất hiệu quả
		2,5	14	0/6	-1,2 (D22)	7 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0170	Rất hiệu quả
chMAb2-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	5	14	0/6	-1,1 (D29)	-10 (D33)	82 (D33)	6/6	3/6	<0,0001	Hiệu quả cao
		2,5	14	0/6	-1,3 (D57)	-8 (D28)	39 (D28)	2/6	1/6	<0,0001	Hiệu quả cao
ch MAb4-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	5	14	0/6	-1,9 (D22)	-5 (D28)	25 (D28)	2/6	0/6	<0,0001	Hiệu quả cao
		2,5	14	0/6	-1,8 (D21)	7 (D25)	-	0/6	0/6	=0,0152	Rất hiệu quả
chMAb5-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	5	14	0/6	-1,8 (D29)	-7 (D33)	65 (D33)	4/6	0/6	<0,0001	Hiệu quả cao
		2,5	14	0/6	-0,8 (D23)	2 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0020	Rất hiệu quả
Đối chứng	-	-	14	-	-3,6 (D29)	-	-	-	-	-	-

[1]Chế phẩm thuốc: HSG (Histidin 10 mM, Glyxin 130 mM, Sucroza 5% theo thể tích, Tween 80 0,01%) độ pH = 7

[2]Giá trị p: Thử nghiệm của Dunett so với đối chứng sau phân tích phương sai 2 chiều với các lần đo lặp lại đối với loại biến đổi các sự thay đổi của thể tích khối u từ đường gốc.

Ví dụ 6: Sự nhân bản của mAb kháng CEACAM5_MAb2 mAb

Trong ví dụ này, các biến thể được nhân bản của IgG MAb2 ở chuột bố mẹ đã được thiết kế mô phỏng. Các mAb thu được được tạo ra và cung cấp các đặc tính giống như IgG ch-MAb2 thể khảm.

Ví dụ 6.1: Giao thức nhân bản 4D

a) Sự nhân bản dựa trên các quỹ đạo động lực học phân tử

Các trình tự VL & VH của nhân bản MAb2 ở chuột được so sánh dựa vào cơ sở dữ liệu protein (PDB) (Berman et al., Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242). Các mẫu sau đây được dùng: khung chuỗi nhẹ và nặng - 3EHB (90,9% vùng chuỗi nhẹ đồng nhất và 90,8% vùng chuỗi nặng đồng nhất), L1-1 I8M, L2-1 F6L, L3-1 P7K, H1-2QHR, H2-1 IGT và H3-1 P4B để tạo ra mẫu tương đồng của LC và HC kháng CEACAM5 bằng cách sử dụng Molecular Operating Environment (MOE) (v. 2011. 10 - Chemical Computing Group, Quebec, Canada). Sau đó, mẫu tương đồng này được giảm thiểu năng lượng bằng cách dùng các quy trình tiêu chuẩn được thực hiện trong MOE.

Sự mô phỏng động lực học phân tử (MD) của mẫutương đồng 3D tối thiểu của MAb2 ở chuột được thực hiện sau đó, với những hạn chế trên xương sống protein ở nhiệt độ 500 K trong 1,1 nano giây (ns) trong dung môi ẩn sinh tổng quát. 10 cấu trúc khác nhau được chiết ra từ MD đầu tiên này chạy mỗi 100 pico giây (ps) cho lần cuối cùng1 ns. Sau đó, các cấu trúc khác nhau này được đưa vào trình mô phỏng MD, không có các sự hạn chế trên xương sống protein và ở nhiệt độ 300 K, trong 2,3 ns. Đối với mỗi trong số 10 lần chạy MD, 2.000 ảnh chụp nhanh quối, một lần mỗi ps, từ quỹ đạo MD sau đó được dùng để tính toán, đối với mỗi axit amin MAb2 ở chuột, căn bậc hai độ lệch bình phương trung bình của nó (rmsd) so với vị trí medoit tham chiếu. Bằng cách so sánh rmsd trung bình trên 10 lần chạy MD riêng rẽ của axit amin đã cho với rmsd trung bình toàn thể của tất cả các axit amin MAb2 ở chuột, một quyết định nếu axit amin này là đủ linh hoạt, như được thấy trong khi MD được coi là có khả năng tương tác với các thụ thể tế bào T và chịu trách nhiệm cho sự hoạt hóa của

phản ứng miễn dịch. 32 axit amin được xác định là linh hoạt trong kháng thể MAb2 ở chuột, trừ CDR và vùng lân cận 5 Å.

Sự chuyển động của 60 axit amin MAb2 linh hoạt nhất ở chuột, trong khoảng thời gian 20 ns (10 x 2 ns) của mô phỏng động lực học phân tử, sau đó được so sánh với chuyển động của các axit amin linh hoạt tương ứng của 49 mẫu tương đồng 3D ở người, đối với mỗi mẫu trong số các mẫu được trên cùng mô phỏng MD. 49 mẫu tế bào gốc ở người đã được tạo ra bằng cách kết hợp có hệ thống bảng đại diện của 7 chuỗi mạch nhẹ (là vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) với bảng đại diện của 7 chuỗi mạch nặng (là vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acid Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

Tổ hợp vk1-vh6 cho thấy sự tương đồng 4D cao nhất (72,6%) của các axit amin linh hoạt của nó so với các axit amin linh hoạt của kháng thể MAb2 ở chuột; do đó mẫu này đã được sử dụng nhân bản kháng thể MAb2 tập trung vào các axit amin linh hoạt. Đối với liên kết axit amin cặp giữa MAb2 ở chuột và các axit amin vk1-vh6, 2 trình tự này đã được liên kết dựa trên sự chồng chất 3D tối ưu của các nguyên tử cacbon alpha của 2 mẫu tương đồng tương ứng.

b) Làm ổn định các đột biến

Để cải thiện sự ổn định của các vùng VL và VH của kháng thể kháng CEACAM5, các axit amin của các chuỗi mạch nhẹ và nặng với tần số xuất hiện thấp so với các trình tự kinh điển của chúng, trừ các CDR, được đề xuất ban đầu để được biến đổi thành các axit amin thường được tìm thấy nhiều nhất ($\Delta\Delta G_{th}$ > 0,5 kcal/mol; (Monsellier et al. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593). Danh sách đầu tiên của các đột biến liên ứng đối với LC và đối với HC bị hạn chế với các axit amin được tìm thấy trong mẫu gần nhất ở người (tức là vk1-vh6). Không đột biến nào trong số những đột biến đổi này được định vị trong khu vực "Vernier" (Foote et al., J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499. Các tiêu chuẩn khác được đưa vào tính toán để xem xét những đột biến liên ứng này đối với khả năng làm ổn định kháng thể mAb2 kháng CECAM5. Các tiêu chuẩn này là sự thay đổi thuận lợi của thủy liệu pháp ở bề mặt hoặc các cơ chế phân tử dựa trên sự làm ổn định

được dự báo của đột biến này. LÀm ổn định các đột biến được báo cáo là thành công trong tài liệu (Bedouelle, H.J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593; Steipe B.J. Mol. Biol. 1994, 240, 188-192) được xem xét.

c) Sự cắt bỏ các mô típ trình tự không mong muốn

Các mô típ của các trình tự sau đây được xem xét: Asp-Pro (liên kết không bền axit), Asn-X-Ser/Thr (glycosyl hóa, X = axit amin bất kỳ nhưng Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (sự tạo thành sucxinimit/iso-asp trong các khu vực linh hoạt), Asn-Gly/anh/Ser/Ala/Cys (các vị trí khử amit tiếp xúc), Met (sự oxy hóa trong khu vực tiếp xúc). Kết quả là, các trình tự được nhân bản đã thổi bay sự tương đồng trình tự so với cơ sở dữ liệu Immune Epitope Data Base (IEDB) ((PLoS Biol (2005) 3(3)e91) http://www.immuneepitope.org) để đảm bảo rằng không trình tự nào trong số các trình tự chứa bất kỳ kháng nguyên tế bào B- hoặc T- đã biết được liệt kê trong đó.

d) Các vùng VH và VL được nhân hoá

Ba phiên bản đối với chuỗi nhẹ (VL1, VL1a, và VL1c) và ba phiên bản đối với chuỗi nặng được đề xuất (VH1, VH1a và VH1b). Tổ hợp đặc biệt của các gốc axit amin được thay đổi trong mỗi biến thể MAb2 VL và VH ở người được nêu trong Bảng 10 và Bảng 11, tương ứng. Các trình tự axit amin đầy đủ của các miền VH và VL được nhân hoá được nêu trong Bảng 12.

Biến thể VL1 biểu hiện 5 đột biến đổi mà thu được từ việc so sánh trực tiếp giữa các axit amin linh hoạt nhất không CDR của chuỗi nhẹ MAb2 kháng CEACAM5 và trình tự chuỗi nhẹ vk1 ở người.

Biến thể VL1a có nguồn gốc từ VL1 và bao gồm 4 đột biến mới mà là liên ứng (tự vk1) và khả năng ổn định. Hơn nữa, 1 trong số những đột biến này định vị vị trí khử amit có thể khó khăn ($D_{17}T_{18}$).

Biến thể VL1c có nguồn gốc từ VL1a với sự đưa vào 1 đột biến R thay vì K ở vị trí 52. Thật vậy, K52 này được định vị trong CDR L2 và có thể là "mục tiêu" cho quá trình liên hợp.

Biến thể VH1a biểu hiện 7 đột biến đổi mà lấy được từ sự so sánh trực tiếp giữa các axit amin linh hoạt nhất không CDR của chuỗi nặng kháng CEACAM5 và trình tự chuỗi nặng vh6 ở người.

Biến thể VH1a có nguồn gốc từ VH1 và bao gồm 4 đột biến mới mà sự liên ứng (trình tự vh6) và khả năng làm ổn định.

Các miền VL và VH của kháng thể MAb2 kháng CEACAM5 được nhân hoá được kết hợp như sau: VL1 và VH1; VL1a và VH1a; VL1c và VH1a; VL1a và VH1b

Bảng 10: Các đột biến của các biến thể VL của kháng thể MAb2 kháng CEACAM5

MAb2 VL ở chuột	VL1	VL1 d	VL1 a	VL1 c
E17	D	D	D	D
T18			R	R
Q40	P	P	P	P
Q45	K	K	K	K
K52		R		R
Q70			D	D
K74	T	T	T	T
N76	S	S	S	S
G84			A	A
S85			T	T

Bảng 11: Các đột biến của các biến thể VH của kháng thể MAb2 kháng CEACAM5

MAb2 VH ở chuột	VH1	VH1a
G9	P	P
V10	G	G
K19	S	S
K43	R	R
R44		G
F60		A
D62	S	S
Q65	K	K
N84		
K87	T	T
I89		V
A113		S

Bảng 12: Các trình tự axit amin VH và VL của các kháng thể kháng CEACAM5 được nhân bản điển hình.

Biến thể VH hoặc VL	Trình tự	SEQ ID NO.
Nhân bản MAb2 VH1	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERRLEWVAYISSGGGITYF PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAIYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA	SEQ ID NO:51
clone MAb2 VH1a	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:5
Nhân bản MAb2 VL1	DIQMTQSPASLSASVGDTVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS	SEQ ID NO:17
	RFSGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	
Nhân bản MAb2 VL1a	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:23
Nhân bản MAb2 VL1c	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:29
Nhân bản MAb2 VL1d	DIQMTQSPASLSASVGDTVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFSGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:55

Ví dụ 6.2: Trình tự của mAb kháng CEACAM5 được nhân hoá

Từ các trình tự axit amin của các biến thể VL và VH mô phỏng, các trình tự axit nucleic đã được lấy và tổng hợp bởi Geneart. Các trình tự này đã được nhân bản thành vật chủ trung gian biểu hiện trong sự hợp nhất với IgG1 ở người hoặc miền không thay đổi Ckappa ở người mã hóa các trình tự tương ứng.

Ví dụ 6.3: Việc tạo ra và mô tả đặc tính in vitro

Các mẻ của các mAb được nhân bản được tạo ra bằng sự biểu hiện thoáng qua trong HEK293 và được tinh chế bằng sắc ký ái lực protein A. Cấu trúc và nhận dạng được xác nhận bằng phân tích SDS-PAGE, sắc ký loại trừ kích thước và khối phổ.

Ai lực đối với CEACAM5 ở người và ở Khỉ *Macaca fascicularis* được xác nhận bằng phương pháp ELISA, EC50 được cung cấp trên Bảng 13.

Bảng 13: Ái lực của mAb kháng CEACAM5 được nhân hoá với CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*

		CEACAM5 ở người		CEACAM5 ở khỉ Macaca fascicularis	
Mã	mAb	EC50 (nM)	CV	EC50 (nM)	CV
huMAb2-1	MAb2VL1VH1-IgG1	0,22	4,7 %	0,20	7,9 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	0,20	9,2 %	0,17	5,0 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	0,18	11 %	0,19	4,3 %
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	0,22	4,3 %	0,17	5,0 %
ch MAb2	MAb2-IgG1	0,16	9,9 %	0,17	3,0 %

Độ đặc hiệu với CEACAM5 ở người so với CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 và CEACAM8 ở người đã được xác nhận bằng phương pháp ELISA. Nó đã được báo cáo là tỷ lệ phần trăm của liên kết so với liên kết đầy đủ CEACAM5 ở người, xem Bảng 14.

Bảng 14: Tỷ lệ phần trăm của liên kết của mAb kháng CEACAM5 được nhân bản với các CEACAM ở người

		hCEA				
Mã	mAb	CAM5	CAM1	CAM6	CAM7	CAM8
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	100 %	0.3 %	0.2 %	0.3 %	0.9 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	100 %	0.3 %	0.3 %	0.3 %	0.5 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	100 %	0.2 %	0.3 %	0.3 %	0.6 %
huMAb2-4	MAb2_VL1d VH1-IgG1	100 %	0.3 %	0.3 %	0.3 %	1.4 %
ch MAb2	MAb2-IgG1	100 %	0.3 %	0.3 %	0.3 %	0.6 %

Miền liên kết kháng nguyên được xác minh bằng kỹ thuật ELISA và cho thấy rằng các biến thể được nhân bản chấp nhận miền A3-B3 cụ thể. Nó đã được báo cáo là tỷ lệ phần trăm liên kết so với liên kết đầy đủ với CEACAM5 ở người trên Bảng 15.

Bảng 15: Tỷ lệ phần trăm liên kết của mAb kháng CEACAM5 được nhân bản với các miền CEACAM5 ở người

		hCEACAM5		
Mã	**mAb**	N-ter-A1-B1	A2-B2	A3-B3
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	0,4%	0,3%	100 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	0,4%	0,3%	100 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	0,4%	0,4%	100 %
huMAb2-4	MAb2_VL1d VH1-IgG1	0,3%	0,3%	100 %
ch MAb2	MAb2-IgG1	0,5%	0.3%	100 %

Động lực học liên kết của các biến thể kháng CEACAM5_MAb2 được nhân bản, so với MAb2 thể khảm, với CEACAM5 tái tổ hợp ở người (hCEACAM5) và CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*(cCEACAM5) được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách dùng BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ).

Ngắn gọn là, chip cảm biến sinh học CM5 BIAcore được đưa vào phương tiện và hoạt hoá với 70 µL NHS/EDC theo tỷ lệ 1:1 ở nhiệt độ phòng. Fc IgG1 kháng nhân ở chuột (BIAcore #BR-1008-1039) (50 µg mL trong dung dịch đệm axetat 1M, độ pH = 5) được cố định trên các chip được kích hoạt ở toàn bộ các tế bào dòng chảy. Sự cố định đã được thực hiện ở tốc độ dòng chảy bằng 10 µL/phút lên đến sự bão hòa. Sau đó, chip này được chặn lại bằng mũi tiêm 70 µL của etanolamin-HCl, pH8.5, tiếp theo bởi một lần rửa với $MgCl_2$ 3M. Để đo liên kết của các mAb kháng CEACAM5 với protein CEACAM5 ở người hoặc

hoặc protein CEACAM5 ở khỉ Macaca , các kháng thể được dùng ở mức từ 1 đến 5 µg/mL trong dung dịch đệm chạy BIAcore (HBS-EP). Các kháng nguyên (CEACAM5 ở người hoặc CEACAM5 ở khỉ Macaca) được tiêm từ 1 đến 500 nM. Sau khi hoàn tất giai đoạn tiêm, sự phân ly được giám sát trong dung dịch đệm chạy BIAcore ở cùng tốc độ dòng chảy trong 600 giây. Bề mặt đã được tái sinh giữa các mũi tiêm dùng 2 x 5 µL_$MgCl_2$ 3M (2 x 30 giây). Các gam cảm biến riêng lẻ được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm BIAevaluation.

Bảng 16: liên kết của mAb kháng CEACAM5 được nhân bản với CEACAM5 ở người và ở khỉ

	CEACAM5 ở người	CEACAM5 ở khỉ Macaca
mAb	KD (nM)	KD (nM)
huMAb2-1	9,8	41,7
huMAb2-2	24,5	96,0
huMAb2-3	11,7	73,5
huMAb2-4	6,9	38,6
ch MAb2	9,9	52.3

Đặc trưng của các biến thể kháng CEACAM5_MAb2 được nhân bản, so với MAb2 thể khảm, với CEACAM5 ở khỉ Macaca so với CECAM1, CEACAM6 và CEACAM8 ở khỉ Macaca được xác minh bằng phương pháp ELISA. Nó được báo cáo là tỉ lệ phần trăm liên kết so với liên kết đầy đủ với CECAM5 hoặc liên kết ở EC_{50}, xem bảng 17 ở dưới

Bảng 17: Tỷ lệ phần trăm liên kết của mAb kháng CEACAM5 được nhân bản với các CEACAM ở khỉ Macaca

		CEA ở khỉ Macaca			
Mã	mAb	CAM5	CAM1	CAM6	CAM8
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	3,6 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	0,9 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	100 %	0,3 %	0,4 %	1,2 %
huMAb2-4	MAb2_VL1d VH1-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	3,2 %
ch MAb2	MAb2-IgG1	100 %	0,2 %	0,3 %	1,2 %

Ví dụ 6.4: Xác định đặc tính của các biến thể được nhân bản của Mab2 thu được bằng cách ghép với các khung tế bào gốc ở người

Trong ví dụ này, các biến thể được nhân bản của Mab2 thu được bằng phương pháp ghép CRD. Hơn nữa, các CDR của kháng thể được nhân bản được trải qua phương pháp quét alanin để chỉ ra rằng một số vị trí có thể được thay thế mà không ảnh hưởng đến liên kết với CECAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*.

Trình tự của một biến thể được nhân bản của Mab2 được tạo ra đầu tiên in silico bằng cách chọn các khung tế bào gốc ở người trên cơ sở tương đồng về cấu trúc với kháng thể Mab2 ở chuột. Đối với chuỗi nhẹ, các vùng khung ở người được chọn được xác định bởi các gen IGKV1D-39*01 và IGKJ2*02 và đối với chuỗi nặng, bởi các gen IGHV3-23*04 và IGHJ4*01. Sáu CDR của $Mab2_{K52R}$ được ghép vào các khung ở người này. Ba đột biến ngược được đưa vào, tương ứng với các vị trí 34 và 53 trong VL (SEQ ID NO.34) (các vùng FR2-L và FR3-L, tương ứng) và vị trí 50 trong VH (SEQ ID NO.33) (vùng FR2-H), dẫn đến trình tự sau đây, được xác định là MAb2_VLg5VHg2.

Bảng 18: Các trình tự VH và VL của MAb2_VLg5VHg2

Biến thể VH hoặc VL	Trình tự	SEQ ID NO.
MAb2_VHg2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSSYDMSWVR QAPGKGLEWVSYISSGGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVT VSS	SEQ ID NO:74
MAb2_VLg5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKP GKAPKLLIYNTRTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQHHYGTPFTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO:75

Một số biến thể của MAb2_VLg5VHg2 thu được bằng cách thay thế duy nhất mỗi axit amin của sáu CDR, tốt hơn là bằng alanin. Khi alanin đã được tìm thấy trong các CDR MAb2_VLg5VHg2, điều này xảy ra ở H-CDR3, axit amin khác bị thay thế (Val ở gốc 97, Arg ở gốc 98 và Asp ở gốc 108 của SEQ ID NO:74).

Từ các trình tự axit amin in silico của các biến thể VL và VH, các trình tự axit nucleic được bắt nguồn và được tạo ra bằng sự tổng hợp gen. Các trình tự đã được nhân bản thành vật chủ trung gian biểu hiện ở động vật có vú dung hợp

với IgG1 ở người hoặc miền không thay đổi Ckappa ở người mã hóa các trình tự tương ứng. MAb2_VLg5VHg2 được nhân hoá, các biến thể đơn khác với nó bằng một vị trí, và một số lượng hạn chế của các đột biến tổ hợp, được tạo ra bằng sự biểu hiện thoáng qua trong các tế bào HEK293. Dịch nổi trên mặt tế bào chứa các IgG được tiết ra (20 đến 70 µg/ml) được pha loãng xuống 1 µg/ml để dùng trong các thử nghiệm liên kết với CEACAM5 ECD ở người, ECD ở khỉ Macaca và miền A3-B3 của CEACAM5 ở người.

Để đánh giá tác động của những biến đổi này, liên kết các IgG được xác định bằng cách đo các tín hiệu SPR với một thiết bị Biacore T200 (GE Healthcare). Các kháng thể Fc kháng nhân được ghép cặp với dòng chip S CM5 qua bộ kit ghép cặp amin để đạt mức 10.000 đơn vị đáp ứng (RU). Khoảng 300 đến 600 RU của mỗi biến thể đã được bắt bằng cách bơm dịch nổi trên mặt ở mức 1mg/mL với thời gian tiếp xúc là 60 giây và lưu lượng là 10 µL/phút. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện ở 25°C với HBS-EP+ (Hepes 10 mM, Nacl 150 mM, EDTA 3 mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05%) làm dung dịch đệm chạy. Ở chế độ sàng lọc, miền CEACAM5 ở người/CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*/A3B3 ở người được tiêm ở mức 50 nM qua các biến thể IgG được bắt ở lưu lượng là 30 µL/phút trong 1 phút. Giai đoạn phân ly được giữ trong 60 giây trước khi bề mặt được tái sinh với 1 mũi tiêm xung của $MgCl_2$ 3 M ở lưu lượng là 10 µL/phút và thời gian tiếp xúc trong 30 giây.

Đối với mỗi thử nghiệm, dữ liệu đáp ứng được xử lý bằng cách sử dụng bề mặt tham chiếu, do đó cho phép điều chỉnh hàng loạt các sự thay đổi về chỉ số khúc xạ và bất kỳ liên kết không đặc hiệu nào. Dữ liệu được tham chiếu hai lần bằng cách sử dụng đáp ứng từ các mũi tiêm trống. Theo phương pháp sàng lọc được mô tả trong ghi chú ứng dụng từ GE Healthcare (ghi chú ứng dụng 28-9777-72 AA), hai thông số được xem xét để xếp hạng các biến thể đối với các đặc tính liên kết. Thứ nhất, hoạt tính liên kết được ước tính bằng tỷ lệ của tín hiệu tối đa theo lý thuyết đo được (tỷ lệ phần trăm của Rmax, xem Hình 16). Thứ hai, tỷ lệ phần trăm của tín hiệu còn lại được tính bằng cách sử dụng các điểm báo cáo phân ly (0 giây đầu tiên sau khi kết thúc mũi tiêm và 50 giây thứ

hai sau khi kết thúc mũi tiêm) và phản ánh sự ổn định của liên kết (xem Hình 17).

Các biến thể alanin đơn ở các vị trí sau đã chứng minh các tham số liên kết tương đương, khi so với kháng thể gốc, cho thấy rằng các axit amin CDR ở những vị trí này là trung tính đối với liên kết: các gốc LC 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 và các gốc HC từ 26 đến 31, từ 51 đến 58, 97, 103, 104, 107, 109. Các trạng thái của các biến thể này tương tự với CEACAM5 ở người và ở khỉ, vì vậy duy trì được khả năng phản ứng chéo của chúng. Sự liên kết với miền A3-B3 của CEACAM5 cũng được thấy là không bị ảnh hưởng. Một số tổ hợp của hai nhóm thế trung tính cũng được tạo ra và được thấy là dẫn đến các tham số liên kết không thay đổi, như được minh họa với sự kết hợp của LC_T51A với LC_T94A, LC_S31A với HC_G54Y, hoặc LC_T53I với HC_S53A.

Ngược lại, ở tất cả các vị trí CDR khác, sự thế của alanin đối với các axit amin ban đầu được thấy là gây ra sự mất hoàn toàn liên kết hoặc các tham số liên kết bị thay đổi đáng kể. Vị trí 101 của chuỗi nặng hoặc các vị trí 32 và 91 của chuỗi nhẹ là các ví dụ được thể hiện trên Hình 16 và 17). Một tập thứ hai của các biến thể trong thử nghiệm bảo toàn hơn các đột biến ở một số vị trí như vậy. Làm vậy, các tác giả sáng chế thấy rằng sự thế bảo toàn sau đây là trung tính đối với liên kết kháng nguyên: Tyr đối với Phe ở gốc 30 của MAb2_VLg5, Phe đối với Tyr ở gốc 92 của MAb2_VLg5, Ser đối với Ala ở gốc 98 của MAb2_VHg2 và Phe đối với Tyr ở gốc 100 của MAb2_VHg2 (được thể hiện trên các hình vẽ).

Ví dụ 7: Các biến thể được nhân bản của các thể liên hợp thuốc MAb2

Ví dụ 7.1: Việc tạo ra và xác định đặc tính

huMAb2-2-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 147360 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 201400; ε_{280nm} (Ab) = 71693

ε_{280nm} (DM4) = 5180; ε_{280nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 19,4 mg huMAb2-2 (C = 5,1 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,375 ml DMA và 0,0439 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5,0 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 2 giờ. Lượng bổ sung 0,0044 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5,0 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào. Sau 2 giờ ở RT dưới khuấy từ, 2 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5 và 0,0702 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 2 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được lọc trên bộ lọc 0,45 µm và tinh chế trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5. Thể liên hợp được rửa giải với histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại và lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, thu được 10,3 ml thể liên hợp huMAb2-2-SPDB-DM4 (c = 1,35 mg/ml) thu được là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp này được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,7; DAR (SEC) = 3,6; RT = 17,29 phút; độ tinh khiết đơn phân = 97,9%.

Kết quả phân tích HRMS được thể hiện trên Hình 12.

huMAb2-1-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 147563 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 201400; ε_{252nm} (Ab) = 69669

ε_{280nm} (DM4) = 5180; ε_{252nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,8 ml dung dịch huMAb2-1 (C = 5,08 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,341 ml DMA và 0,0392 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (4,5 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Lượng bổ sung 0,0087 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (1,0

Eq - dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào. Sau 2 giờ ở RT dưới khuấy từ, 2,62 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,254 ml DMA và 0,076 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 1 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được lọc trên bộ lọc 0,45 µm và tinh chế trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5. Thể liên hợp được rửa giải với histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại và lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, thu được 9,5 ml thể liên hợp huMAb2-1-SPDB-DM4 (c = 1,35 mg/ml) là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 4,1; DAR (SEC) = 4,0; RT = 17,39 phút; độ tinh khiết đơn phân = 96,7%.

Kết quả phân tích HRMS được hiển thị trên Hình 13.

huMAb2-3-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 147417 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 201400; ε_{252nm} (Ab) = 7 45

ε_{280nm} (DM4) = 5180; ε_{252nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,8 ml dung dịch huMAb2-3 (C = 5,09 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,336 ml DMA và 0,0437 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Lượng bổ sung 0,0035 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (0,4 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào. Sau 1 giờ ở RT dưới khuấy từ, 2,60 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,248 ml DMA và 0,074 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 1 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được lọc trên bộ lọc 0,45 µm và tinh chế trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV histidin (10mM), glyxin (130mm),

sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5. Thể liên hợp được rửa giải với histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại và lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, thu được 11 ml thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 (c = 1,08 mg/ml) là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,9; DAR (SEC) = 3,8; RT = 17,44 phút; độ tinh khiết đơn phân = 98,4%.

Kết quả phân tích HRMS được hiển thị trên Hình 14.

huMAb2-4-SPDB-DM4

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 147628 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 20 00; ε_{252nm} (Ab) = 70628

ε_{280nm} (DM4) = 5180; ε_{252nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 3,8 ml dung dịch huMAb2-4 (C = 5,09 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 0,345 ml DMA và 0,0448 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (5 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được tạo xoáy trong 30 giây và sau đó khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Lượng bổ sung 0,0027 ml dung dịch liên kết nitro-SPDB (0,3 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào. Sau 1 giờ ở RT dưới khuấy từ, 2,70 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,5, 0,263 ml DMA và 0,075 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 1 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được lọc trên bộ lọc 0,45 µm và tinh chế trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), được xử lý trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5. Thể liên hợp được rửa giải với histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại và lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, thu được 11 ml thể liên hợp huMAb2-4-SPDB-DM4 (c = 1,23 mg/ml) là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được phân tích

đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,8; DAR (SEC) = 3,8; RT = 17,53 phút; độ tinh khiết đơn phân = 99,3%.

Kết quả phân tích HRMS được hiển thị trên Hình 15.

Ví dụ 7.2: Độc tính tế bào in vitro

Vật liệu và các phương pháp:

Hiệu quả của các thể liên hợp tác nhân gây độc tế bào kháng CEACAM5 đối với khả năng tồn tại của tế bào khối u được đánh giá như được mô tả trong ví dụ 3.4.

Các kết quả:

Bảng 19: Các hoạt tính gây độc tế bào của các ADC được nhân bản đặc hiệu CEACAM5 đối với dòng tế bào CEACAM5 + MKN45

ADC	Hoạt tính gây độc tế bào IC_{50} (nM) ± StD
chMAb2-SPDB-DM4	0,24 ± 0,02
huMAb2-1-SPDB-DM4	0,18 ± 0,01
huMAb2-2-SPDB-DM4	0,23 ± 0,02
huMAb2-3-SPDB-DM4	0,16 ± 0,01
ADC không liên quan	8,52 ± 2,07

Các thể liên hợp chMAb2-SPDB-DM4, huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4, và huMAb2-3-SPDB-DM4 và thể liên hợp không liên quan DM4 cho thấy các hoạt tính gây độc tế bào in vitro đối với các tế bào MKN45 nuôi cấy với t IC50 tương ứng là 0,24, 0,18, 0,23, 0,16, và 8,52 nM. Các hoạt tính gây độc tế bào của các thể liên hợp kháng CEACAM5 là thấp hơn từ 53 đến 35 lần so với hoạt tính đo được của thể liên hợp không liên quan DM4 cho thấy các hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian CEACAM5 của các thể liên hợp kháng CEACAM5.

Ví dụ 7.3: Hiệu quả chống lại các khối u CR-IGR-034P đại tràng nguyên phát in vivo được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái trụi lông CD-1.

Vật liệu và phương pháp

Hai trình tự được nhân bản là các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-4-SPDB-DM4 được đánh giá ở 4 mức liều lượng so với chMAb2-SPDB-DM4, chống lại các khối u đại tràng nguyên phát CR-IGR-034P có thể đo

được được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái trụi lông CD-1. Các nhóm đối chứng không được điều trị được để lại. Các liều lượng của các thể liên hợp được đưa ra bằng mg/kg. Chúng được dùng ở mức 10, 5, 2,5 và 1,25 mg/kg bằng tiêm liều tĩnh mạch (IV), vào ngày 19 sau khi cấy ghép khối u.

Đánh giá độc tính và hiệu quả được thực hiện như đã báo cáo trong ví dụ 5.

Các kết quả:

Các kết quả được trình bày trong Hình 5 và Bảng 20 (ở dưới).

Sử dụng liều đơn ở mức 1,25, 2,5, 5 và 10 mg/kg, tất cả các thể liên hợp được thử nghiệm trong nghiên cứu này không gây ra độc tính.

huMAb2-4-SPDB-DM4 và chMAb2-SPDB-DM4 có hoạt tính cao ở mức 10 mg/kg với ΔT/ΔC là -4% ($p < 0,0001$ so với đối chứng) và sự thoái hoá khối u tương ứng là 21 và 19%, hoạt tính ở mức 5 mg/kg với ΔT/ΔC bằng 12 ($p = 0,0105$ so với đối chứng) và 17% ($p = 0,0417$ so với đối chứng), hoạt tính tương đương và thấp hơn một chút ở mức 2,5 mg/kg với ΔT/ΔC là 36 và 37% (không đáng kể so với đối chứng), tương ứng, và không hoạt tính ở mức 1,25 mg/kg. huMAb2-3-SPDB-DM4 có hoạt tính cao ở mức 10 mg/kg với ΔT/ΔC là -6% ($p < 0,0001$ so với đối chứng) và sự thoái hoá khối u là 31%, rất hoạt tính ở mức 5 mg/kg với ΔT/ΔC là 4% ($p < 0,0001$ so với đối chứng), hoạt tính ở mức 2,5 mg/kg với ΔT/ΔC là 12 ($p = 0,0322$ so với đối chứng) và hoạt tính thấp hơn một chút ở mức 1,25 mg/kg với ΔT/ΔC là 34% (không đáng kể so với đối chứng).

Từ những kết quả này, cả hai trình tự được nhân hoá huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-4-SPDB-DM4 là có thể được dùng để phát triển ADC điều trị. huMAb2-3-SPDB-DM4 là trình tự tốt nhất trong số hai trình tự này.

Bảng 20: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-4-SPDB-DM4 và chMAb2-SPDB-DM4 chống lại ung thư ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở những con chuột cái CD-1.

Bảng 20: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-4-SPDB-DM4 và chMAb2-SPDB-DM4 chống lại ung thư ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở những con chuột cái CD-1.

Tác nhân[1]	Đường dùng/ Liều lượng theo mL/kg	Liều lượng theo mg/kg mỗi mũi tiêm	Lịch tiêm theo ngày	Chết do thuốc (ngày)	Sự thay đổi trọng lượng cơ thể trung bình theo % ở mỗi con chuột ở điểm đáy (ngày của điểm đáy)	Trung bình ΔT/ΔC theo % (ngày)	Trung bình theo % của sự thoái hoá (ngày)	Sự thoái hoá		Thống kê sinh học giá trị p[2]	Lời chú thích
								Một phần	Hoàn toàn		
chMAb2-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	10	19	0/6	-7,3 (D20)	-4 (D32)	19 (D32)	2/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính cao
		5	19	0/6	-4,5 (D45)	12 (D32)	-	0/6	0/6	= 0,0105	Hoạt tính
		2,5	19	0/6	-4,2 (D20)	36 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Hoạt tính thấp hơn
		1,25	19	0/6	-4,1 (D20)	42 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Không hoạt tính
huMAb2-3-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	10	19	0/6	-4,3 (D27)	-6 (D35)	31 (D35)	2/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính cao
		5	19	0/6	-3,3 (D20)	4 (D38)	-	0/6	0/6	< 0,0001	Rất hoạt tính
		2,5	19	0/6	-5,4 (D45)	12 (D38)	-	0/6	0/6	= 0,0322	Hoạt tính
		1,25	19	0/6	-3,0 (D27)	34 (D38)	-	0/6	0/6	ns	Hoạt tính thấp hơn
huMAb2-4-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	10	19	0/6	-3,7 (D22)	-4 (D32)	21 (D32)	2/6	0/6	< 0,0001	Rất hoạt tính
		5	19	0/6	-3,2 (D27)	17 (D32)	-	0/6	0/6	= 0,0417	Rất hoạt tính
		2,5	19	0/6	-3,4 (D20)	37 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Hoạt tính thấp hơn
		1,25	19	0/6	-2,8 (D27)	50 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Không hoạt tính
Đối chứng	-	-	19	-	- 3,9 (D24)		-	-	-	-	-

[1]Chế phẩm thuốc: HSG (Histidin 10 mM, Glyxin 130 mM, Sucroza 5% theo thể tích, Tween 80 0,01%) độ pH = 7

[2]Giá trị p: Thử nghiệm của Dunett so với đối chứng sau phân tích phương sai 2 chiều với các lần đo lặp lại đối với loại biến đổi các sự thay đổi của thể tích khối u từ đường gốc; ns: không đáng kể

Ví dụ 7.4: Hiệu quả chống lại các khối u dạ dày nguyên phát STO-IND-006 in vio được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái SCID

Vật liệu và phương pháp

Thể liên hợp miễn dịch được nhân bản huMAb2-3-SPDB-DM4 được đánh giá ở 3 mức liều lượng chống lại các khối u dạ dày nguyên phát STO-IND-006 có thể đo được được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái SCID. Các nhóm đối chứng không được điều trị được để lại. Các liều lượng của các thể liên hợp được đưa ra bằng mg/kg. Chúng được dùng ở mức 10, 5 và 2,5 mg/kg bằng tiêm liều tĩnh mạch (IV), vào ngày 27 sau khi cấy ghép khối u.

Đánh giá về độc tính và hiệu quả được thực hiện như được báo cáo trong ví dụ 5.

Các kết quả:

Sử dụng liều đơn ở mức 2,5, 5 và 10 mg/kg, huMAb2-3-SPDB-DM4 không gây ra độc tính.

Như được thể hiện trên Hình 6 và trong Bảng 21, huMAb2-3-SPDB-DM4 là rất hoạt tính ở mức 10 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ là 7% ($p < 0,0001$ so với đối chứng), là hoạt tính ở mức 5 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ là 36% ($p = 0,0281$ so với đối chứng) và không hoạt động ở mức 2,5 mg/kg.

Bảng 21: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 chống lại ung thư tuyến dạ dày nguyên phát ở người STO-IND-006 ở những con chuột cái SCID

Bảng 21: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 chống lại ung thư tuyến dạ dày nguyên phát ở người STO-IND-006 ở những con chuột cái SCID

Tác nhân[1]	Đường dùng/ Liều lượng theo mL/kg	Liều lượng theo mg/kg mỗi mũi tiêm	Lịch tiêm theo ngày	Chết do thuốc (ngày)	Sự thay đổi trọng lượng cơ thể trung bình theo % ở mỗi con chuột ở điểm đáy (ngày của điểm đáy)	Trung bình ΔT/ΔC theo % (ngày)	Trung bình theo % của sự thoái hoá (ngày)	Sự thoái hoá		Thống kê sinh học giá trị p[2]	Lời chú thích
								Một phần	Hoàn toàn		
huMAb2-3-SPDB-DM4	IV (10mL/Kg)	10	27	0/6	-10,5 (D45)	7 (D34)	-	0/6	0/6	< 0,0001	Rất hoạt tính
		5	27	0/6	-8,4 (D45)	36 (D45)	-	0/6	0/6	= 0,0281	Hoạt tính
		2,5	27	0/6	-5,8 (D45)	50 (D38)	-	0/6	0/6	ns	Không hoạt tính
Đối chứng	-	-	27	-	- 2,5 (D38)	-	-	-	-	-	-

[1]Chế phẩm thuốc: HSG (Histidin 10 mM, Glyxin 130 mM, Sucroza 5% theo thể tích, Tween 80 0,01%) độ pH = 7

[2]Giá trị p: Thử nghiệm của Dunett so với đối chứng sau phân tích phương sai 2 chiều với các lần đo lặp lại đối với loại biến đổi các sự thay đổi của thể tích khối u từ đường gốc; ns: không đáng kể

50259

Ví dụ 7.5: Hiệu quả chống lại các khối u phổi nguyên phát LUN-NIC-0014 in vivo được cấy ghép s.c. ở những con chuột SCID

Vật liệu và phương pháp

Thể liên hợp miễn dịch được nhân bản huMAb2-3-SPDB-DM4 được đánh giá ở 3 mức liều lượng chống lại các khối u phổi nguyên phát LUN-NIC-0014 có thể đo được được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái SCID. Các nhóm đối chứng không được điều trị được để lại. Các liều lượng của các thể liên hợp được đưa ra bằng mg/kg. Chúng được dùng ở mức 10, 5 và 2,5 mg/kg bằng tiêm liều tĩnh mạch (IV), vào ngày 29 sau khi cấy ghép khối u.

Đánh giá về độc tính và hiệu quả được thực hiện như được báo cáo trong ví dụ 5.

Các kết quả

Sử dụng liều đơn ở mức 2,5, 5 và 10 mg/kg, huMAb2-3-SPDB-DM4 không gây ra độc tính.

Như được thể hiện trên Hình 18 và trong Bảng 22, huMAb2-3-SPDB-DM4 là rất hoạt tính cao ở mức 10 và 5 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ thấp hơn 0% ($p < 0,0001$ so với đối chứng) và sự thoái hoá khối u tương ứng là 67 và 57% và hoạt tính ở mức 2,5 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ là 12% ($p = 0,0363$ so với đối chứng).

Bảng 22[1]: Đánh giá hoạt tính chống khối u của thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 chống lại ung thư tuyến phổi nguyên phát ở người LUN-NIC-0014 ở những con chuột cái CD-1.

Tác nhân[1]	Đường dùng/ Liều lượng theo mL/kg	Liều lượng theo mg/kg mỗi mũi tiêm	Lịch tiêm theo ngày	Chết do thuốc (ngày)	Sự thay đổi trọng lượng cơ thể trung bình theo % ở mỗi con chuột ở điểm đáy (ngày của điểm đáy)	Trung bình ΔT/ΔC theo % (ngày 42)	Trung bình theo % của sự thoái hoá (ngày 42)	Sự thoái hoá		Thống kê sinh học giá trị p[2]	Lời chú thích
								Một phần	Hoàn toàn		
huMAb2-3-SPDB-DM4	IV (10 mL/kg)	10	29	0/6	+1,7 (D32)	< 0	67	5/6	1/6	< 0,0001	Hoạt tính cao
		5	29	0/6	-1,1 (D36)	< 0	57	4/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính cao
		2.5	29	0/6	+0,5 (D32)	12 (D39)	-	0/6	0/6	0,0363 (D39)	Hoạt tính
Đối chứng	-	-	-	-	+0,1 (D34)	-	-	-	-	-	-

[1]Chế phẩm thuốc: HSG (Histidin 10 mM, Glyxin 130 mM, Sucroza 5% theo thể tích, Tween 80 0,01%) độ pH = 7
[2]Giá trị p: Thử nghiệm của Dunett so với đối chứng sau phân tích phương sai 2 chiều với các lần đo lặp lại đối với loại biến đổi các sự thay đổi của thể tích khối u từ đường gốc; ns: không đáng kể

50259

Ví dụ 7.6: Hiệu quả chống lại các khối u đại tràng nguyên phát CR-IGR-034P được cấy ghép s.c. ở những con chuột cái SCID

Vật liệu và phương pháp

Ba thể liên hợp, cấu thành bởi huMAb2-3 được nhân bản liên hợp với DM4 qua hai chất liên kết khác nhau (SPDB và sulfo-SPDB), được đánh giá ở 2 mức liều lượng chống lại các khối u đại tràng nguyên phát ở người CR-IGR-034P có thể đo được được cấy s.c. ở những con chuột cái SCID. Các nhóm đối chứng không được điều trị được để lại. Các liều lượng của các thể liên hợp được đưa ra bằng mg/kg. chúng được dùng ở mức 5 và 2,5 mg/kg bằng liều tiêm tĩnh mạch (IV), vào ngày 19 sau khi cấy ghép khối u.

Đánh giá về độc tính và hiệu quả được thực hiện như được báo cáo trong ví dụ 5.

Các kết quả

Sử dụng liều đơn ở mức 2,5 và 5 mg/kg, huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 không gây ra độc tính.

Như được thể hiện trên Hình 18 và Bảng 23, huMAb2-3-SPDB-DM4 là hoạt tính ở mức 5 và 2,5 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ tương ứng là 12% và 40%, ($p < 0,0001$ so với đối chứng), huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 là hoạt tính cao ở mức 5 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ thấp hơn 0% ($p < 0,0001$ so với đối chứng) và sự suy thoái khối u là 12% và hoạt tính ở mức 2,5 mg/kg với $\Delta T/\Delta C$ là 1% ($p < 0,0001$ so với đối chứng).

Bảng 23: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 chống lại ung thư tuyến ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở những con chuột cái SCID

Bảng 23: Đánh giá hoạt tính chống khối u của các thể liên hợp huMAb2-3-SPDB-DM4 và huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 chống lại ung thư tuyến ruột kết nguyên phát ở người CR-IGR-034P ở những con chuột cái SCID

Tác nhân[1]	Đường dùng/ Liều lượng theo mL/kg	Liều lượng theo mg/kg mỗi mũi tiêm	Lịch tiêm theo ngày	Chết do thuốc (ngày)	Sự thay đổi trọng lượng cơ thể trung bình theo % ở mỗi con chuột ở điểm đáy (ngày của điểm đáy)	Trung bình ΔT/ΔC theo % (ngày 34)	Trung bình theo % của sự thoái hoá (ngày 34)	Sự thoái hoá		Thống kê sinh học giá trị p[2]	Lời chú thích
								Một phần	Hoàn toàn		
huMAb2-3-SPDB-DM4	IV (10 mL/kg)	5	19	0/6	+1,6 (D20)	12	-	0/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính
		2,5	19	0/6	-1,5 (D38)	40	-	0/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính thấp hơn
huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4	IV (10 mL/kg)	5	19	0/6	+0,1 (D20)	< 0	12	0/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính cao
		2,5	19	0/6	+0,7 (D20)	11	-	0/6	0/6	< 0,0001	Hoạt tính
		2,5	19	0/6	+2,5 (D20)	66	-	0/6	0/6	0,0306	Không hoạt tính
Đối chứng	-	-	-	-	+0,5 (D34)	-	-	-	-	-	-

[1]Chế phẩm thuốc: HSG (Histidin 10 mM, Glyxin 130 mM, Sucroza 5% theo thể tích, Tween 80 0,01%) độ pH = 7
[2]Giá trị p: Thử nghiệm của Dunett so với đối chứng sau phân tích phương sai 2 chiều với các lần đo lặp lại đối với loại biến đổi các sự thay đổi của thể tích khối u từ đường gốc; ns: không đáng kể

Ví dụ 8: Việc phát triển giao thức hoá mô miễn dịch (IHC) dành riêng cho việc phát hiện protein CEACAM5 ở người và ở khỉ ở các mô được cố định bằng formalin và được nhúng paraphin (FFPE).

Các nguyên liệu và các phương pháp

Các mô

Các vi chuỗi mô FFPE (TMA, Bảng 24) được dùng như nguồn gốc của người (khối u và không khối u) cũng như các mô (bình thường) của khỉ cynomolgus.

Bảng 24: Các vi chuỗi mô được cố định bằng formalin và được nhúng paraphin được dùng làm các nguồn mô

Đối chứng	Nhà cung cấp	Mô tả
ASM221	Pantomics	Khỉ Cyno, 22 cơ quan, 22 mẫu
CyFDA	US Biomax	Vi chuỗi mô bình thường ở khỉ Cyno, 33 cơ quan, được lấy từ 6 cá thể bình thường (99 trường hợp)
COC1501	Pantomics	Chuỗi mô ung thư ruột kết, 150 nhân tử các mô bình thường/lành (5 trường hợp) và các mô ung thư (70 trường hợp)
COC1502	Pantomics	Chuỗi mô ung thư ruột kết, 150 nhân tử các mô bình thường/lành (5 trường hợp) và các mô ung thư (70 trường hợp)
COC1503	Pantomics	Chuỗi mô ung thư ruột kết, 150 nhân tử các mô bình thường/lành (5 trường hợp) và các mô ung thư (70 trường hợp)
MTU951	Pantomics	40 loại khối u bao phủ các thực thể lành, ác tính và di căn của 27 vị trí giải phẫu
LUC1501	Pantomics	Vi chuỗi mô ung thư phổi, 150 nhân tử các mô bình thường/lành (5 trường hợp) và các mô ung thư phổi (70 trường hợp)
LUC1502	Pantomics	Vi chuỗi mô ung thư phổi, 150 nhân tử các mô bình thường/lành (5 trường hợp) và các mô ung thư phổi (70 trường hợp)
LUC1503	Pantomics	Vi chuỗi mô ung thư phổi, 150 nhân tử các mô bình thường/lành (5 trường hợp) và các mô ung thư phổi (70 trường hợp)
MNO961	Pantomics	35 loại của các mô bình thường trên cơ sở khuyến nghị FDA đối với thử nghiệm phản ứng chéo
MNO661	Pantomics	33 loại của các mô bình thường trên cơ sở khuyến nghị FDA đối với thử nghiệm phản ứng chéo

(tiếp tục)

Đối chứng	Nhà cung cấp	Mô tả
MNO341	Pantomics	33 loại của các mô bình thường trên cơ sở khuyến nghị FDA đối với thử nghiệm phản ứng chéo
PAC481	Pantomics	Chuỗi mô ung thư tuỵ chứa 20 trường hợp các ung thư và 4 trường hợp trường hợp của các mô tuỵ bình thường và không ác tính
CC4	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 59 trường hợp ung thư phổi
A218(III)	Accumax	Chuỗi mô ung thư thực quản chứa 40 trường hợp các khối u và 8 không khối u
A219(II)	Accumax	Chuỗi mô ung thư đầu và cổ chứa 45 trường hợp của các khối u và 8 không khối u
A213(II)	Accumax	Chuỗi mô ung thư buồng trứng chứa 43 trường hợp của các khối u và 8 không khối u
A301(IV)	Accumax	Chuỗi các mô ung thư khác nhau với các mô bình thường tương ứng (30 trường hợp ung thư, 30 trường hợp không khối u)
A103(V)	Accumax	Chuỗi các mô bình thường khác nhau nhân đôi (45 trường hợp)
MAN2	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 9 hoặc 10 trường hợp bình thường của dạ dày, thực quản, phổi, đại trực tràng, tuyến giáp và thận

(tiếp tục)

Đối chứng	Nhà cung cấp	Mô tả
MA2	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 9 hoặc 10 trường hợp của các ung thư dạ dày, thực quản, phổi, đại trực tràng, tuyến giáp và thận
MBN4	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 9 hoặc 10 trường hợp bình thường của vú, gan, bàng quang buồng trứng, tuyến tuỵ, tuyến tiền liệt
MB4	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 9 hoặc 10 trường hợp của các ung thư vú, gan, bàng quang buồng trứng, tuyến tuỵ, tuyến tiền liệt
MCN4	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 9 hoặc 10 trường hợp bình thường của nội mạc tử cung, túi mật thanh quản, cổ tử cung, da
MC4	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 9 hoặc 10 trường hợp của các ung thư nội mạc tử cung, túi mật thanh quản, cổ tử cung, u lym phô, u melamin
CJ1	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 59 trường hợp ung thư buồng trứng
CDN3	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 59 trường hợp ruột kết và trực tràng bình thường
CCN2	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 59 trường hợp phổi bình thường (trùng hợp CC4)
BB5	Superbiochips	60 nhân, 30 dạng ung thư khác nhau ở người
AA9	Superbiochips	Chuỗi 59 nhân chứa 59 trường hợp cơ quan bình thường
TMAhu3a	Asterand	Chuỗi các mô ung thư khác nhau (76 trường hợp)
STC1501	Pantomics	Chuỗi mô ung thư dạ dày, 150 nhân chứa 75 trường hợp bình thường, phản ứng và các mô ung thư của dạ dày
STC1502	Pantomics	Chuỗi mô ung thư dạ dày, 150 nhân chứa 75 trường hợp bình thường, phản ứng và các mô ung thư của dạ dày
STC1503	Pantomics	Chuỗi mô ung thư dạ dày, 150 nhân chứa 75 trường hợp bình thường, phản ứng và các mô ung thư của dạ dày
STC481	Pantomics	Chuỗi mô ung thư dạ dày, 16 trường hợp, 48 nhân, một bình thường ghép đôi với hai nhân mô khối u từ mỗi bệnh nhân

Các kháng thể

MAb2 được dùng làm kháng thể đơn dòng CEACAM5 kháng nhân ở chuột thứ nhất. IgG1 kháng chuột ở dê được liên hợp biotin (trình tự γ1) (reference 1070-08, batch L4309-X761, Southern Biotech, USA) được dùng làm kháng thể thứ hai.

Sự nhuộm màu miễn dịch

Quy trình thu hồi kháng nguyên được áp dụng với dung dịch đệm điều hoà tế bào 1 (CC1) ở 95°C trong 8 phút và sau đó ở 100°C trong 28 phút. Sau bước chặn các biotin nội dung, các slide được ủ với kháng thể được pha loãng trong dung dịch đệm chứa muối phosphat (PBS) ở mức 5 µg/mL trong 2 giờ ở 24°C. Kháng thể thứ hai kháng chuột ở dê được liên hợp biotin được ủ ở 24°C trong 32 phút ở mức 0,5 µg/mL. Sự nhuộm màu miễn dịch đã được thực hiện với 3,3-diaminobenzidin tetrahydroclorua (DAB) từ bộ kit phát hiện sinh màu DABMap™ (760-124, Medical Systems Ventana, Inc, USA) theo các khuyến cáo của nhà sản xuất. Bước phản nhuộm màu được thực hiện với hematoxylin (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA) và thuốc thử hoá xanh được sử dụng (760-2037, Medical Systems Ventana, Inc, USA). Các slide được nhuộm màu được khử nước và được che phủ bằng kính với cytoseal XYL (8312-4, Richard-Allan Scientific, USA).

Điểm IHC

Các slide được nhuộm màu miễn dịch được quét bằng cách sử dụng hệ thống ScanScope XT (Aperio Technologies, Vista, CA). Các ảnh kỹ thuật số được chụp bằng cách sử dụng phần mềm ImageScope (phiên bản 10.2.2.2319, Aperio Technologies) ở độ phóng đại 20 lần.

Đánh giá sự nhuộm màu bao gồm cả vị trí mô học của phản ứng, loại chính của tế bào phản ứng, cường độ nhuộm màu và tần suất nhuộm màu tế bào. Các mẫu âm tính được cho điểm là 0+. Các mẫu dương tính được cho điểm với tỷ lệ của cường độ nằm trong khoảng từ 1+ đến 4+. Các khoảng cường độ được mô tả là yếu]0; 2+[, trung bình [2+; 3+[và mạnh [3+; 4+]. Tần số tế bào là tỷ lệ phần trăm của các tế bào được nhuộm màu miễn dịch và được ước tính bằng sự

quan sát mô học là trung bình bởi mẫu. Tần số tế bào đã được sắp thứ tự theo 5 loại điểm tỷ lệ: 1 (0-5%), 2 (6-25%), 3 (26-50%), 4 (51 -75%) và 5 (76-100%).

Đối với các khối u, điểm biểu hiện chung được điều chỉnh từ điểm Allred (AS) (Mohsin S, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh LD, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. Mod. Pathol. 2004; 17: 1545-1554). AS này thu được bằng cách tăng thêm cường độ và các điểm tỷ lệ để thu được điểm tổng nằm trong khoảng từ 0 đến 9. AS này được báo cáo là phần trăm của điểm chung tối đa và dao động trong 5 loại: rất thấp (0-25%), yếu (26-50%), trung bình (51 -75%), và cao (76-100%). Tỷ lệ phổ biến được xác định là phần trăm của các trường hợp dương tính đối với chỉ định phân tích thống kê mô tả.

Các thống kê mô tả được tính toán với phần mềm Microsoft Excel 2003. Đối với mỗi chỉ định, số các trường hợp, số các trường hợp dương tính, tỷ lệ phổ biến, trung bình điểm cường độ, trung bình tần số, trung bình điểm Allred, dải cường độ, dải tần số và dải điểm Allred đã được mô tả.

Ví dụ 8.1: Dùng kháng thể đơn dòng kháng CEACAM5 để đánh giá protein CEACAM5 ở các khối u FFPE ở người bằng hoá mô miễn dịch (IHC)

Bảng lớn của các khối u của được nghiên cứu bằng cách dùng các slide chuỗi mô thương mại (dạng FFPE). Sự biểu hiện của protein CEACAM5 được định vị trong màng +/- bào tương của các tế bào khối u (Hình 1C, D). Một số sự nhuộm màu màng tế bào bị phân cực ở cực đỉnh của các tế bào ở các khối u biệt hoá nhiều hơn. pProtein CEACAM5 được thấy là được biểu hiện ở:

• 89% các trường hợp ung thư tuyến đại tràng (194/219, cường độ 2-2,5+, tần số 53-59%, AS 60-66%)

• 49% các trường hợp ung thư tuyến dạ dày (95/195, cường độ 2,5+, tần số 53%, AS 62%)

• 41% các trường hợp ung thư tuyến phổi (24/58, cường độ 1,8-2+, tần số 50-53%, AS 54-58%)

• 79% các trường hợp ung thư biểu mô vảy cổ tử cung (11/14, cường độ 2+, tần số 22%, AS 46%)

• 53% các trường hợp ung thư tuyến tụy (18/34, cường độ 2+, tần số 23%, AS 42%)

• 37% các trường hợp ung thư biểu mô tế bào vảy thực quản (23/62, cường độ 2+, tần số 16%, AS 38%)

• 4% các trường hợp ung thư biểu mô buồng trứng (3/77, cường độ 2+, tần số 43%, AS 54%)

• 11% các trường hợp ung thư biểu mô tuyến giáp (2/18, cường độ 1,5+, tần số 63%, AS 56%)

• 25% các trường hợp ung thư biểu mô bàng quang (5/20, cường độ 1,5+, tần số 61%, AS 56%)

• 7% các trường hợp ung thư tuyến nội mạc tử cung (1/14, cường độ 2+, tần số 50%, AS 56%)

• 11% các trường hợp ung thư biểu mô ống động mạch vú (2/18, cường độ 1,5+, tần số 53%, AS 50%)

• 53% các trường hợp ung thư đường mật (2/6, cường độ 1,5+, tần số 75%, AS 50%)

• 53% các trường hợp ung thư biểu mô tế bào vảy phổi (31/148, cường độ 1,5+, tần số 22%, AS 39%)

• 8% các trường hợp ung thư tuyến tiền liệt (1/13, cường độ 2+, tần số 50%, AS 44%)

• 25% các trường hợp ung thư biểu mô vảy da (2/8, cường độ 1,5+, tần số 23%, AS 39%)

Ví dụ 8.2: Phản ứng chéo mô của kháng thể đơn dòng kháng CEACAM5 ở khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) và so với mẫu biểu hiện ở người

Miền protein ngoại bào của CEACAM5 có nguồn gốc từ người (h) hoặc khỉ cynomolgus (c) đã được bào chế bằng sự biểu hiện thoáng qua ở các tế bào thận phôi thai ở người HEK293 với plasmit cADN CEACAM5 (ví dụ 1, Bảng 1). Các hạt nhỏ tế bào được cố định trong formalin 10% (Sigma Aldrich, USA) trong 16 giờ, và nhúng trong parafin như là mẫu mô theo quy trình mô học tiêu chuẩn.

TMA thương mại được dùng như nguồn các mô bình thường ở người và ở khỉ (Bảng 21).

Phản ứng chéo của Mab2 được thể hiện bằng sự nhuộm màu miễn dịch ở cả các tế bào chuyển nhiễm CEACAM5 ở người và ở khỉ (sự khu trú màng tế bào và bào tương).

Ở các mô bình thường ở khỉ cynomolgus, biểu hiện protein CEACAM5 đã được tìm thấy trong các tế bào biểu mô hấp thụ hình trụ (2/3 các trường hợp dương tính, cường độ trung bình 1,5+, tần số trung bình 55%).

Ở các mô không khối u ở người, biểu hiện CEACAM5 cũng được quan sát thấy trong các tế bào biểu mô hấp thụ hình trụ (62/64 các trường hợp dương tính, cường độ trung bình 2+, tần số trung bình 90%). Trong các mô ở người, biểu hiện CEACAM5 đã được quan sát ở phạm vi hẹp hơn trong các tế bào biểu mô thực quản, các tế bào biểu mô đầu và cổ, các tế bào biểu mô hố dạ dày và các tế bào biểu mô cổ tử cung.

Ví dụ 9: Liên hợp kháng thể thuốc (biến thể)

huMAb2-3-sulfoSPDB-DM4 kháng CEACAM5

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 147417 g/mol; MW (DM4) = 780,38 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 201400; S ε_{252nm} (Ab) = 71451

ε_{280nm} (DM4) = 5180; ε_{252nm} (DM4) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 7,0 ml dung dịch huMAb2-3 kháng CEACAM5 (C = 5,32 mg/ml trong dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4) được cho vào bình, tiếp theo là 1,6 ml DMA và 168,4 µl dung dịch liên kết Nitro-sulfoSPDB (được mô tả trong WO2009134977) (10 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được khuấy chậm ở RT trong 3 giờ. Lượng bổ sung 3,4 µl dung dịch liên kết nitro-sulfoSPDB (2,0 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào. Sau 2 giờ ở RT dưới khuấy từ, 2,90 ml PBS dung dịch đệm có độ pH = 7,4, 0,407 ml DMA và 0,322 ml dung dịch DM4 (dung dịch 15 mM trong DMA) được thêm vào liên tục. Sau 1 giờ ở RT, và 16 giờ ở 5°C, hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE healthcare), được xử lý

trước với 1 CV NaOH 1 M, 2 CV nước và 2 CV histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5. Thể liên hợp được rửa giải với histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại và lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, thu được 19 ml thể liên hợp huMAb2-3-sulfoSPDB-DM4 kháng CEACAM5 (c = 1,51 mg/ml) là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 3,4; DAR (SEC) = 3,3; độ tinh khiết đơn phân = 99,8%; dữ liệu HRMS: xem Hình 20.

huMAb2-3-SMCC-DM1 kháng CEACAM5

Dữ liệu phân tích:

MW (Ab) = 147417 g/mol; MW (DM1) = 738 g/mol

ε_{280nm} (Ab) = 201400; ε_{252nm} (Ab) = 71451

ε_{280nm} (DM1) = 5180; ε_{252nm} (DM1) = 26159

Dưới khuấy, ở RT, 11,3 ml dung dịch huMAb2-3 kháng CEACAM5 (C = 3,47 mg/ml trong dung dịch đệm có độ pH = 6,5) được cho vào bình, tiếp theo là 0,387 ml DMA và 178 µl dung dịch liên kết SMCC (10 Eq - dung dịch 15 mM trong DMA). Dung dịch được khuấy chậm ở RT trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng thô được trao đổi dung dịch đệm trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), được xử lý trước với 2CV NaOH 0,2m, 5 CV nước và 5 CV dung dịch đệm xitrat (độ pH = 5,5). Thể liên hợp được rửa giải với dung dịch đệm xitrat (độ pH 5.5) và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại và lọc trên bộ lọc 0,22µm. Dưới khuấy, ở RT, 0,476 ml DMA và 0,124 ml dung dịch DM1 được thêm vào liên tục vào (dung dịch 15 mM trong DMA). Sau 2 giờ ở RT, hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế hai lần trên cột khử muối HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), được xử lý trước với 2CV NaOH 0,2m, 5 CV nước và 5 CV histidin (10mM), glyxin (130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5. Thể liên hợp được rửa giải với histidin (10mM), glyxin

(130mm), sucroza (5%), dung dịch đệm có độ pH = 5,5, và các phần nhỏ thể liên hợp đơn phân được gộp lại, được lọc trên bộ lọc 0,22µm.

Vì thế, thu được 9,5 ml huMAb2-3-SMCC-DM1 kháng CEACAM5 (c = 1,73 mg/ml) là dung dịch trong suốt không màu. Sau đó, thể liên hợp được phân tích đối với tải lượng thuốc cuối cùng và độ tinh khiết đơn phân: DAR (UV) = 2,7; DAR (SEC) = 2,9; độ tinh khiết đơn phân = 99,6%; dữ liệu HRMS: xem Hình 21.

Ví dụ 10: Mô tả đặc tính của epitope và paratope của CEACAM5-A3B3 trong phức hợp với MAb2 VH1aVL1c Fab bằng cách sử dụng trao đổi hydro-đoteri kết hợp với khối phổ (HDX MS)

Ví dụ 10.1: Nguyên tắc của HDX MS

Trảo đổi hydro-đoteri amit (HDX) kết hợp với khối phổ (MS) cho phép xác định các vùng của các protein bao hàm trong các sự thay đổi về hình dạng hoặc các sự tương tác. Kỹ thuật này cho phép xác định cụ thể hơn các vùng hiển thị kháng nguyên, sau khi ủ trong dung dịch đệm đã được đoteri và phân giải protein, sự giảm hợp nhất đoteri trong hình dạng của nó gắn với kháng thể so với hình dạng tự do của nó.

Epitope thuộc về các vùng này, sự trao đổi bị chậm lại bởi liên kết với kháng thể. Một bài báo gần đây mô tả chi tiết các bước khác nhau để mô tả đặc tính các epitope bằng cách sử dụng kỹ thuật này (Zhang, Q., Willison, L. N., Tripathi, P., Sathe, S. K., Roux, K. H., Emmett, M. R., Blakney, G. T., Zhang, H. M. & Marshall, A. G. (2011). Analytical Chemistry 83, 7129-7136).

Ví dụ 10.2: Vật liệu

Các trình tự mã hoá miền biến đổi của MAb2_VH1aVL1c (SEQ ID NO:5 vàSEQ ID NO:29) được nhân bản thành vật chủ trung gian biểu hiện ở động vật có vú kết hợp với các trình tự mã hóa miền CH1 ở người (như được tìm thấy trong IgG1 đã tách papain bắt nguồn từ các Fab), tiếp theo là hexa-histidin hoặc với miền không thay đổi Ckappa ở người, tương ứng. Mẻ MAb2_VH1aVL1c Fab được tạo ra trong môi trường nuôi cấy huyền phù các tế bào HEK293-FS™ bằng sự chuyển nhiễm thoáng qua của hai plasmit biểu hiện, mã hóa hai chuỗi

này, phức hợp với 293fectin™ (Invitrogen). Dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy chứa protein tiết ra được thu gom bảy ngày sau chuyển nhiễm, được ly tâm và được lọc trên màng lọc 0,22 µm. Fab được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên IMAC (HisTrap, GE Healthcare) bằng cách sử dụng gradient imidazol trong PBS. Sau đó, nhóm các phần nhỏ chứa Fab được tinh chế bằng sắc ký loại trừ kích thước (Superdex 200, GE Healthcare) được cân bằng với PBS.

Miền hCEACAM5-A3B3 được gắn thẻ của nó (SEQ ID NO:67) được tạo ra với các tế bào HEK293-FS™ nuôi cấy trong bình bằng sự chuyển nhiễm thoáng qua của plasmit biểu hiện. Kifunensin (chất ức chế quá trình glycosyl hóa cắt tỉa) đã được thêm vào mỗingày. Dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy chứa protein tiết ra được thu gom bảy ngày sau chuyển nhiễm, được ly tâm và lọc trên màng lọc 0,22 µm. EndoH đã được thêm vào dịch nổi trên bề mặt lên đến 625 u/ml sau đó ủ trong 3 giờ ở 37°C. hCEACAM5-A3B3 đã khử glycosyl hoá được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên IMAC (HisTrap, GE Healthcare) bằng cách sử dụng gradient imidazol trong PBS. Sau đó, nhóm các phần nhỏ chứa hCEACAM5-A3B3 đã khử glycosyl hóa được tinh chế bằng sắc ký loại trừ kích thước (Superdex 200, GE Healthcare) được cân bằng với PBS. Phân tích khối phổ của hCEACAM5-A3B3 đã khử glycosyl hóa cho thấy hai loại (22 485 và 22 278 Da), chỉ ra rằng các protein này mang 7 hoặc 8 gốc N-Axetylglucosamin (GlcNAc).

Để tạo phức, cả hai protein, được gộp chung với lượng dư 1,5 mol hCEACAM5-A3B3 đã khử glycosyl hóa cho một mol Fab. Lượng dư này được loại bỏ bằng sắc ký loại trừ kích thước trên Superdex 200 cân bằng với dung dịch đệm chứa muối phosphat. Các phần nhỏ tương ứng với phức Fab với kháng nguyên đã được dùng cho nghiên cứu trao đổi đơteri.

Ví dụ 10.3: Phương pháp

Các thử nghiệm trao đổi hydro/đơteri (HDX) được tự động hoá hoàn toàn bằng cách sử dụng thiết bị lấy mẫu tự động PAL (phân tích CTC). Nó cho phép sự trao đổi bắt đầu và dập tắt, kiểm soát nhiệt độ phân giải protein (4°C), tiêm các peptit đã được đơteri, quản lý việc tiêm và làm sạch các van và kích hoạt sự

tiếp nhận của phối khổ kế và các bơm HPLC. Hộp Peltier được làm mát (4°C) chứa hai van tự động Recodyn (6 cổng để phun và 10 cổng để rửa), hộp khử muối (bẫy vi peptit từ Bruker-Michrom) và cột HPLC (Poroshell 120 EC-C18, 1 x 50 mm, 2,7 µM từ Agilent Technologies). Sự đoteri được bắt đầu bằng sự pha loãng CEACAM5 5 lần , mAb hoặc phức với PBS trong D_2O. GndHCl 2M, TCEP 0,8 M, Glyxin 1 M được sử dụng để dập tắt sự trao đổi ngược và khử các cầu disunfit trong 2 phút ở 4°C.

Các protein được tiêu hóa với các proteaza pepsin và nepenthesin và các peptit này được khử muối bằng cách sử dụng bơm HPLC Agilent Technologies với TFA 0,03% trong nước ở mức 100 µL/phút. Các peptit sau đó được tách ra bằng cách sử dụng bơm HPLC Agilent Technologies khác với gradient từ 15 đến 100% B trong 20 min (A: TFA 0,03% trong nước; B: axetonitril 90%, TFA 0,03% trong nước). Khối lượng của các peptit được đo bằng cách sử dụng khối phổ kế electrospray-TOF (Agilent 6210).

Các peptit được xác định bởi MS song song (MSMS), bằng cách sử dụng Bruker APEX-Q FTMS (9,4 T) và Bruker 12 T SolariX.

Các phần mềm Data Analysis (Bruker) và Mass Hunter (Agilent Technologies) được dùng để thu thập dữ liệu. Data Analysis và Mascot (Matrix Science) được dùng để xử lý dữ liệu MSMS. Các phần mềm Mass Hunter và HD Examiner (Sierra Analytics) được dùng để xử lý dữ liệu HDX.

Các thử nghiệm HDX được lặp lại ít nhất ba lần.

Ví dụ 10.4: Kết quả

Sự xác định và lựa chọn các peptit

Các cầu disunfit vẫn còn nguyên vẹn trong quá trình đoteri để giữ thông tin cấu trúc có liên quan đến chúng. Để thuận lợi cho sự phân giải protein và sự xác định các peptit các cầu này được khử với TCEP sau bước dập tắt ở độ pH thấp và nhiệt độ thấp. Dùng MSMS sau khi tiêu hóa phức CEACAM5-Fab là đã có thể xác định một số lượng lớn các peptit sinh ra từ ba chuỗi protein này. Sau các thử nghiệm HDX chỉ những peptit cho các tín hiệu chất lượng tốt được chọn: 25, 30 và 20 peptit từ kháng nguyên CEACAM5-A3-B3, chuỗi nặng

MAb2_VH1aVL1c Fab và chuỗi nhẹ MAb2_VH1aVL1c, tương ứng. Các peptit này bao phủ 89%, 77% và 68% kháng nguyên CEACAM5-A3-B3, các trình tự chuỗi nặng MAb2_VH1aVL1c Fab và chuỗi nhẹ MAb2_VH1aVL1c, tương ứng (Bảng 25). Các vùng không được bao phủ của các chuỗi Fab chủ yếu là ở các phần đầu cuối C của chúng.

Bảng 25: Sự bao phủ trình tự với các peptit được đoteri

Các peptit	Sự bao phủ trình tự
CEACAM5-A3-B3	1-18; 1-22; 1-23; 1-19; 23-35; 36-51; 35-49; 50-70; 36-43; 44-51; 36-51; 36-49; 50-67; 37-49; 44-49; 59-67; 71-89; 93-107; 108-115; 128-143; 128-142; 143-157; 130-143; 130-142; 140-143; 163-186
Chuỗi nặng MAb2_VH1aVL1c Fab	1-6; 1-20; 1-19; 1-17; 1-18; 4-18; 5-20; 5-18; 24-29; 27-32; 27-29; 34-46; 47-68; 48-68; 50-68; 69-86; 84-93; 88-98; 92-104; 100-109; 110-115; 116-136; 111-128; 149-158; 151-158; 159-177; 162-177; 167-177; 187-206
Chuỗi nhẹ MAb2_VH1aVL1c	1-11; 5-11; 22-46; 47-54; 55-70; 55-71; 72-82; 87-104; 105-115; 117-132; 124-131; 127-145; 133-144; 136-145; 136-143; 136-144; 143-161; 144-151; 146-151

Tất cả 8 gốc asparagin mà có các vị trí tiềm năng cho các sự glycosyl hoá được xác định trong phạm vi vài peptit với một GlcNAc còn lại từ sự khử glycosyl hoá H bên trong. Cụ thể là, N114 đã được tìm thấy trong peptit 108-115. Trong các thử nghiệm đầu tiên (không dùng cho HDX), N166 đã được tìm thấy trong cả hai dạng (có và không có GlcNAc). Nó có thể giải thích tính không đồng nhất quan sát thấy trong khối phổ của CEACAM5-A3B3 sau khi khử glycosyl hóa, tương ứng với 7 và 8 GlcNAc.

Sự xác định epitope và paratope

Các kháng nguyên tự do, Fab tự do và phức của chúng được đoteri trong thời gian 2 phút hoặc 20 phút ở 4°C hoặc 20 phút ở nhiệt độ phòng (26°C). Xem xét động học trao đổi của các hydro amit với nhiệt độ (sự trao đổi tăng khoảng 3 lần với 10°C) với điều kiện cuối cùng là tương đương với 200 phút đoteri ở 4°C.

Epitope

Động học của sự hợp nhất đoteri đối với 25 peptit được chọn của CEACAM5-A3B3 được so sánh khi kháng nguyên được đoteri ở dạng tự do và khi nó ở dạng phức hợp với Fab. Một số peptit không cho thấy bất kỳ sự khác biệt HDX đáng kể nào (ΔHDX) giữa hai trạng thái. Ngược lại, một vào trông số các peptit (108-115 và 128-143), cho thấy ΔHDX đáng kể. Vùng thứ hai được

bảo phủ với 5 peptit khác nhau: 128-142, 128-143, 130-142, 130-143 và 140-143 cho thấy ΔHDX 13-15 ± 2% (lên đến 1,6 ± 0,2 D) sau 2 phút đơteri.

So sánh 128-142 với 130-142 và 128-143 với 130-143, các tác giả sáng chế không đo được bất kỳ sự thay đổi ΔHDX đáng kể nào trong mỗi trường hợp (1,3-1,4 D cho hai peptit đầu tiên và 1,6 cho hai peptit cuối cùng, sau 2 phút đơteri), có nghĩa là các amit W129 và R130 có thể không tham gia vào epitope. Ngược lại, so sánh 128-142 với 128-143 và 130-142 với 130-143, các tác giả sáng chế đã đo được sự thay đổi ΔHDX nhỏ (khoảng 0,2 D), có nghĩa là amit F143 có tham gia. ΔHDX trong peptit 140-143 (khoảng 0,3 D) chỉ ra rằng cá amit V141 hoặc L142 có thể cũng được tham gia. Trong 9 amit từ I131 đến Q140, một số trong số chúng được tham gia vào epitope (khoảng 1 ΔHDX phân chia trên trung bình).

Các sự khác biệt của sự hợp nhất đơteri chỉ ra rằng epitope thuộc về cụ thể là các vùng (các amit), tức là các peptit của các trình tự SGANLNL (SEQ ID NO:76) và INGIPQQHTQVLF (SEQ ID NO:77).

Paratope

Động học của sự hợp nhất đơteri đối với 30 peptit được chọn của chuỗi nặng Fab được so sánh khi Fab đã được đơteri ở dạng tự do và khi nó ở dạng phức hợp với kháng nguyên. Gần như tất cả các peptit không cho thấy bất kỳ ΔHDX đáng kể nào giữa hai trạng thái. Chỉ có một peptit (100-109) thể hiện ΔHDX sau 200 phút đơteri: 11 ± 2% (0,7 ± 0,2 D). Vùng (các amit) 101-109 của chuỗi nặng MAb2_VH1aVL1c Fab được bao hàm trong paratope.

Động học của sự hợp nhất đơteri đối với 20 peptit được chọn của chuỗi nhẹ Fab được so sánh khi Fab đã được đơteri ở dạng tự do và khi nó ở dạng phức hợp với kháng nguyên. Gần như tất cả các peptit không cho thấy bất kỳ ΔHDX đáng kể nào giữa hai trạng thái. Chỉ có hai peptit (47-54 và 87-104) thể hiện sự khác biệt. Sau 20 phút đơteri, nó là 10 ± 2% (0,6 ± 0,2 D) đối với peptit đầu tiên và 5 ± 2% (0,9 ± 0,2 D) cho peptit thứ hai, tương ứng. Các vùng 48-54 và 88-104 của chuỗi nhẹ MAb2_VH1aVL1c được tham gia vào paratope.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập mà:

a) liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis*; và

b) phản ứng chéo không đáng kể với CEACAM1 ở người, CEACAM6 ở người, CEACAM7 ở người, CEACAM8 ở người; CEACAM1 ở khỉ *Macaca fascicularis*, CEACAM6 ở khỉ *Macaca fascicularis*, CEACAM8 ở khỉ *Macaca fascicularis*, trong đó kháng thể được phân lập đã nêu bao gồm:

a) CDR1-H gồm có trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO:83) trong đó mỗi X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 và X_6 là axit amin bất kỳ; và

CDR2-H gồm có trình tự dài có từ 6 đến 10 axit amin, trong đó axit amin bất kỳ có thể có mặt ở vị trí trí bất kỳ; và

CDR3-H gồm có trình tự $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO:84) trong đó mỗi X_1, X_4, X_5, X_6, và X_7 là axit amin bất kỳ, X_2 là A hoặc S, và X_3 là Y, F hoặc W; hoặc

b) CDR1-L gồm có trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO:85) trong đó mỗi X_1, X_2, X_3 và X_5 là axit amin bất kỳ, và X_4 là Y, F hoặc W; và

CDR2-L gồm có trình tự NX_1X_2 trong đó mỗi X_1 và X_2 là axit amin bất kỳ; và

CDR3-L gồm có trình tự $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$ (SEQ ID NO:86) trong đó mỗi X_1, X_2, X_4, X_5, X_6 và X_7 là axit amin bất kỳ, X_3 là Y, F hoặc W; hoặc

c) cả a và b.

2. Kháng thể theo điểm 1, liên kết với miền A3-B3 ở người và của CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis*:

a) với tỷ lệ ái lực đối với CEACAM5 ở người trên ái lực đối với CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* mà là <12; hoặc

b) với ái lực đối với CEACAM5 ở người và/hoặc CEACAM5 ở khỉ *Macaca fascicularis* mà là <10nM, hoặc

c) cả a và b.

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này liên kết với hai vùng của miền A3-B3 của protein CEACAM5 ở người mà bao gồm chuỗi SEQ ID NO:76 và SEQ ID NO:77, tương ứng.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) CDR1-H gồm có trình tự GFX_1FSSYD (SEQ ID NO:78) trong đó X_1 là T, A hoặc V; và

CDR2-H gồm có trình tự $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO:79) trong đó X_1 là S hoặc N, X_2 là Y hoặc G, X_3 là R hoặc I; và

CDR3-H gồm có trình tự $X_1AHYFGX_2SGPFAY$ (SEQ ID NO:80) trong đó X_1 là A hoặc T, và X_2 là T hoặc S; hoặc

b) CDR1-L gồm có trình tự ENIFSY (SEQ ID NO:10) hoặc ENIYSY (SEQ ID NO:22); và

CDR2-L gồm có trình tự NX_1X_2 trong đó X_1 là A hoặc T, và X_2 là K hoặc R, và

CDR3-L gồm có trình tự QHHYGTPFT (SEQ ID NO:12) hoặc QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24), hoặc

c) cả a và b

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) CDR1-H gồm có trình tự $GFTFSX_1YX_2$ (SEQ ID NO:81) trong đó X_1 là R hoặc S, và X_2 là A hoặc D; và

CDR2-H gồm có trình tự $ISSGGX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO:82) trong đó X_1 không có, S hay G, X_2 là D, Y hay I, và X_3 là T hoặc I; và

CDR3-H gồm có trình tự ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) hoặc ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); hoặc

b) CDR1-L gồm có trình tự QNVGTN (SEQ ID NO:4); và

CDR2-L gồm có trình tự SAS; và

CDR3-L gồm có trình tự QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) hoặc QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18), hoặc

c) cả a và b.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) CDR1-H của trình tự SEQ ID NO:1 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:1 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-H của trình tự SEQ ID NO:2 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:2 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR3-H của trình tự SEQ ID NO:3 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:3 bởi một sự thay thế axit amin; CDR1-L của trình tự SEQ ID NO:4 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:4 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-L của trình tự SAS hoặc trình tự khác với SAS bởi một sự thay thế axit amin và CDR3-L của trình tự SEQ ID NO:6 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:6 bởi một sự thay thế axit amin; hoặc

b) CDR1-H của trình tự SEQ ID NO:7 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:7 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-H của trình tự SEQ ID NO:8 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:8 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR3-H của trình tự SEQ ID NO:9 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:9 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR1-L của trình tự SEQ ID NO:10 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:10 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-L của trình tự NTK hoặc NTR hoặc trình tự khác với NTK hoặc NTR bởi một sự thay thế axit amin và CDR3-L của trình tự SEQ ID NO: 12 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:12 bởi một sự thay thế axit amin; hoặc

c) CDR1-H của trình tự SEQ ID NO:13 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:13 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-H của trình tự SEQ ID NO:14 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:14 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR3-H của trình tự SEQ ID NO:15 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:15 bởi một sự thay thế axit amin; CDR1-L của trình tự SEQ ID NO:16 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:16 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-L của trình tự SAS hoặc trình tự khác với SAS bởi một sự thay thế axit amin và CDR3-L của trình tự SEQ ID NO:18 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:18 bởi một sự thay thế axit amin; hoặc

d) CDR1-H của trình tự SEQ ID NO:19 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:19 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-H của trình tự SEQ ID NO:20 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:20 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR3-H của trình tự SEQ ID NO:21 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:21 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR1-L của trình tự SEQ ID NO:22 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:22 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-L của trình tự NAK hoặc trình tự khác với NAK bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin và CDR3-L của trình tự SEQ ID NO:24) hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:24 bởi một sự thay thế axit amin; hoặc

e) CDR1-H của trình tự SEQ ID NO:25 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:25 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-H của trình tự SEQ ID NO:26 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:26 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR3-H của trình tự SEQ ID NO:27 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:27 bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin; CDR1-L của trình tự SEQ ID NO:28 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:28 bởi một sự thay thế axit amin; CDR2-L của trình tự NAK; hoặc trình tự khác với NAK bởi một hoặc nhiều sự thay thế axit amin và CDR3-L của trình tự SEQ ID NO:30 hoặc trình tự khác với SEQ ID NO:30 bởi một sự thay thế axit amin.

7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó sự thay thế axit amin đã nêu là sự thay thế axit amin bảo toàn.

8. Kháng thể theo điểm bất kì trong số các điểm từ điểm 1 đến 7, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:31 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:32, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

b) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:33, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:34, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

c) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:35, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:36, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

d) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:37, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:38, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; hoặc

e) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:39, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó, và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:40, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó.

9. Kháng thể được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này cạnh tranh để liên kết với miền A3-B3 của các protein CEACAM5 ở người và ở khỉ *Macaca fascicularis* với kháng thể bao gồm các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm:

a) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:31 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:32;

b) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:33 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:34;

c) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:33 và một miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:34, trong đó K ở vị trí 52 đã được thay thế bởi R;

d) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:35 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:36;

e) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:37 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:38; và

f) kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:39 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:40.

10. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể là kháng thể dạng khảm hoặc được nhân hoá.

11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:41 và/hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:42; hoặc

b) chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:43 và/hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:44; hoặc

c) chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:45 và/hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:46; hoặc

d) chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:47 và/hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:48; hoặc

e) chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:49 và/hoặc chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:50.

12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:5, hay SEQ ID NO:74; và/hoặc

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:55, hoặc SEQ ID NO:75.

13. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:51 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:17, hoặc

b) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:5 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:23, hoặc

c) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:5 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:29, hoặc

d) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:51 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:55, hoặc

e) miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:74 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO:75.

14. Kháng thể theo điểm từ 1 đến 4, 6, 8, 9, 10, 12 và 13, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) chuỗi nặng gồm có trình tự SEQ ID NO:87 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó; và/hoặc

b) chuỗi nhẹ gồm có trình tự SEQ ID NO:88 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó.

15. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, mà là đoạn kháng thể.

16. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó kháng thể là chuỗi nặng biến đổi của kháng thể đơn miền (VHH).

17. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu.

18. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó kháng thể là đoạn được chọn từ nhóm gồm có Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, và các diabody.

19. Axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18.

20. Tế bào chủ đã được biến nạp axit nucleic theo điểm 19.

21. Thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18 được liên hợp hoặc liên kết với ít nhất một tác nhân ức chế sự tăng trưởng.

22. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 21, trong đó tác nhân ức chế sự tăng trưởng đã nêu là tác nhân gây độc tế bào hoặc đồng vị phóng xạ.

23. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 21 hoặc 22 trong đó tác nhân ức chế sự tăng trưởng đã nêu được chọn từ nhóm gồm có các tác nhân hóa trị liệu, các enzym, các chất kháng sinh, và các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố hoạt tính enzym, các taxoit, các vinca, các taxan, tác nhân gây độc tế bào hoặc các chất tương tự tác nhân gây độc tế bào, các dẫn xuất tomaymyxin hoặc

pyrolobenzodiazepin, các dẫn xuất cryptophyxin, các dẫn xuất leptomyxin, các chất tương tự auristatin hoặc dolastatin, các tiền dược chất, các chất ức chế topoisomeraza II, các chất alkyl hóa ADN, các chất kháng tubulin, và các chất tương tự CC-1065 hoặc CC-1065.

24. Thể liên hợp miễn dịch theo các điểm từ 21 đến 23, trong đó tác nhân ức chế sự tăng trưởng đã nêu là ($N^{2'}$-deaxetyl-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine) DM1 hoặc $N^{2'}$-deaxetyl-N-$^{2'}$(4-metyl-4-mercapto-1-oxopentyl)-maytensine (DM4).

25. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 24, trong đó kháng thể được liên kết cộng hóa trị qua mối liên kết có thể tách ra được hoặc không thể tách ra được với ít nhất một tác nhân ức chế tăng trưởng.

26. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 25, trong đó mối liên kết đã nêu được chọn từ nhóm gồm có N-suxinimidyl pyridyldithiobutyrat (SPDB), axit 4-(pyridin-2-yldisulfanyl)-2-sulfo-butyric (sulfo-SPDB), và suxinimidyl (N-maleimidometyl) xyiclohexan-1-cacboxylat (SMCC).

27. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 26, trong đó kháng thể bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng của trình tự SEQ ID NO:5 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của trình tự SEQ ID NO 29.

28. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 27, trong đó kháng thể bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự SEQ ID NO: 87 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó và chuỗi nhẹ gồm có trình tự SEQ ID NO: 88 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 85% với nó.

29. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 28, trong đó thể liên hợp miễn dịch được đặc trưng bởi tỉ lệ thuốc-với-kháng thể (DAR) nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

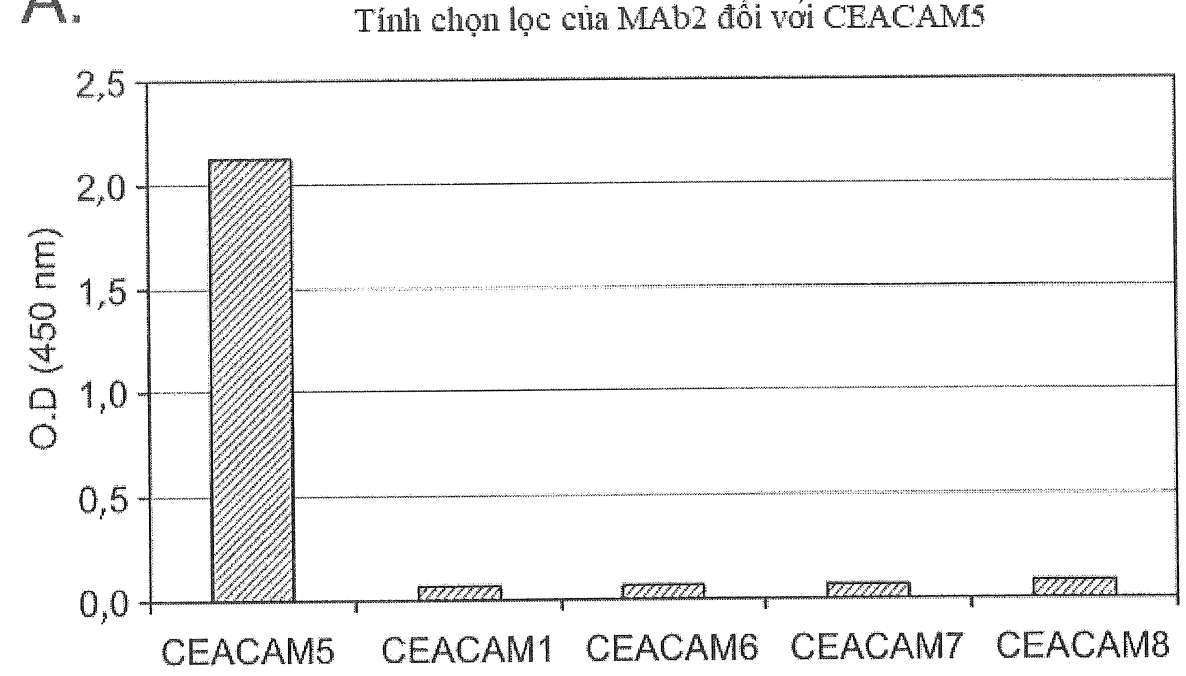
30. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 29, và chất mang dược dụng.

31. Thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể chứa CDR1-H của trình tự SEQ ID NO:7, CDR2-H của trình tự SEQ ID NO:8, CDR3-H của trình tự SEQ ID

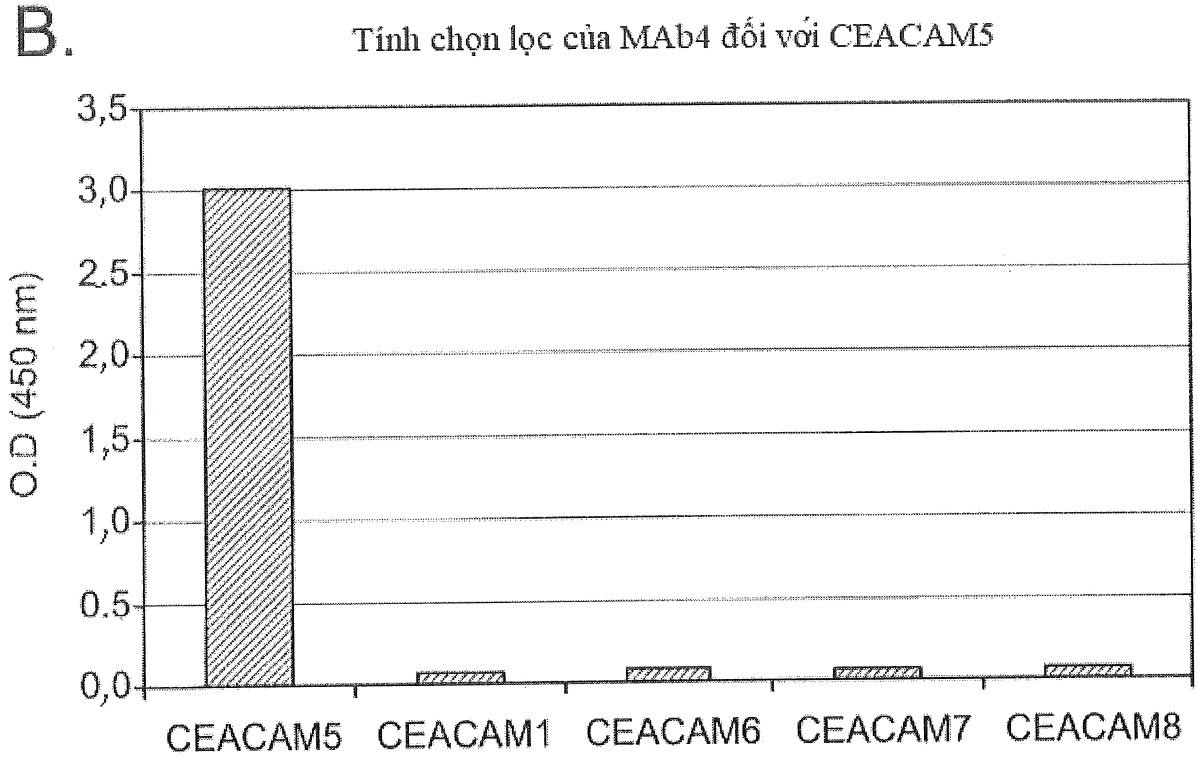
NO:9, CDR1-L của trình tự SEQ ID NO:10, CDR2-L của trình tự NTR và CDR3-L của trình tự SEQ ID NO:12 trong đó kháng thể là liên kết cộng hoá trị N-suxinimidyl pyridyl dithiobutyrat với $N^{2'}$-deaxetyl-N-$^{2'}$ (4-metyl-4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansin (DM4).

32. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 31, trong đó kháng thể chứa chuỗi nặng gồm có trình tự SEQ ID NO:87 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự SEQ ID NO:88.

A.

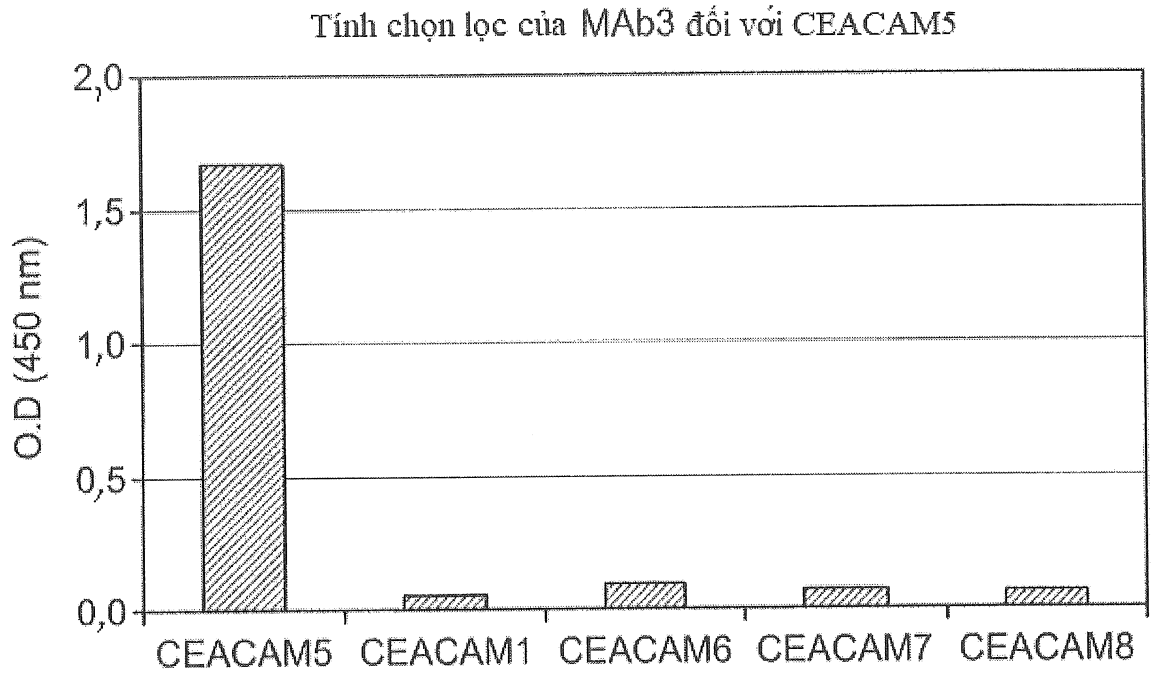


B.

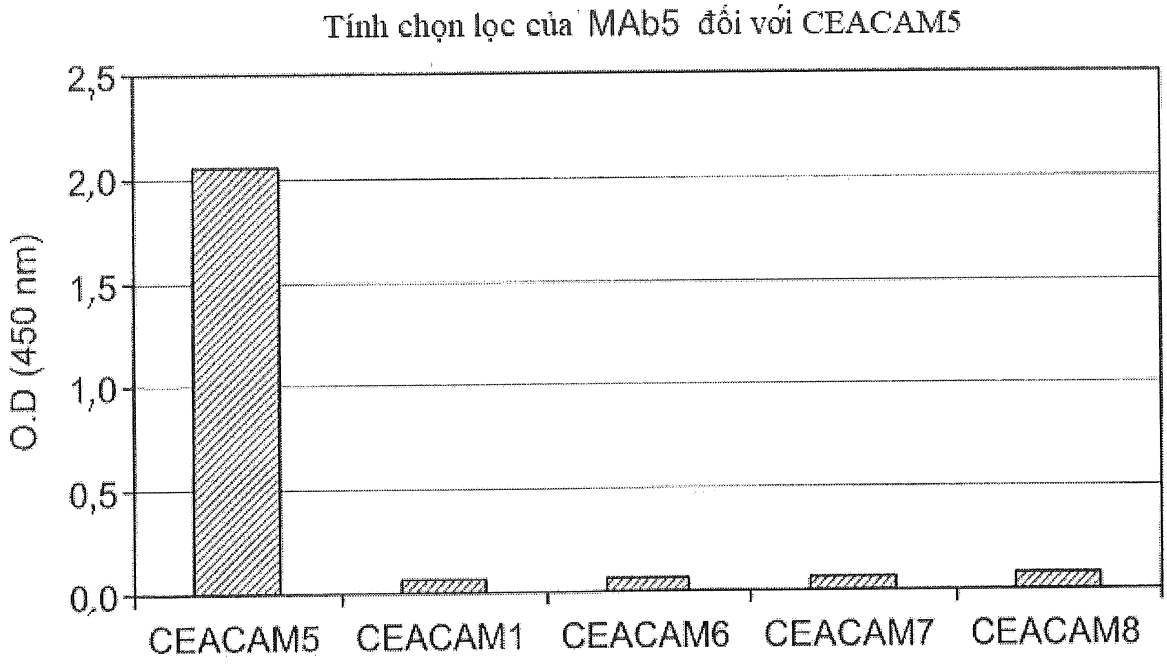


HÌNH 1: Bắt đầu

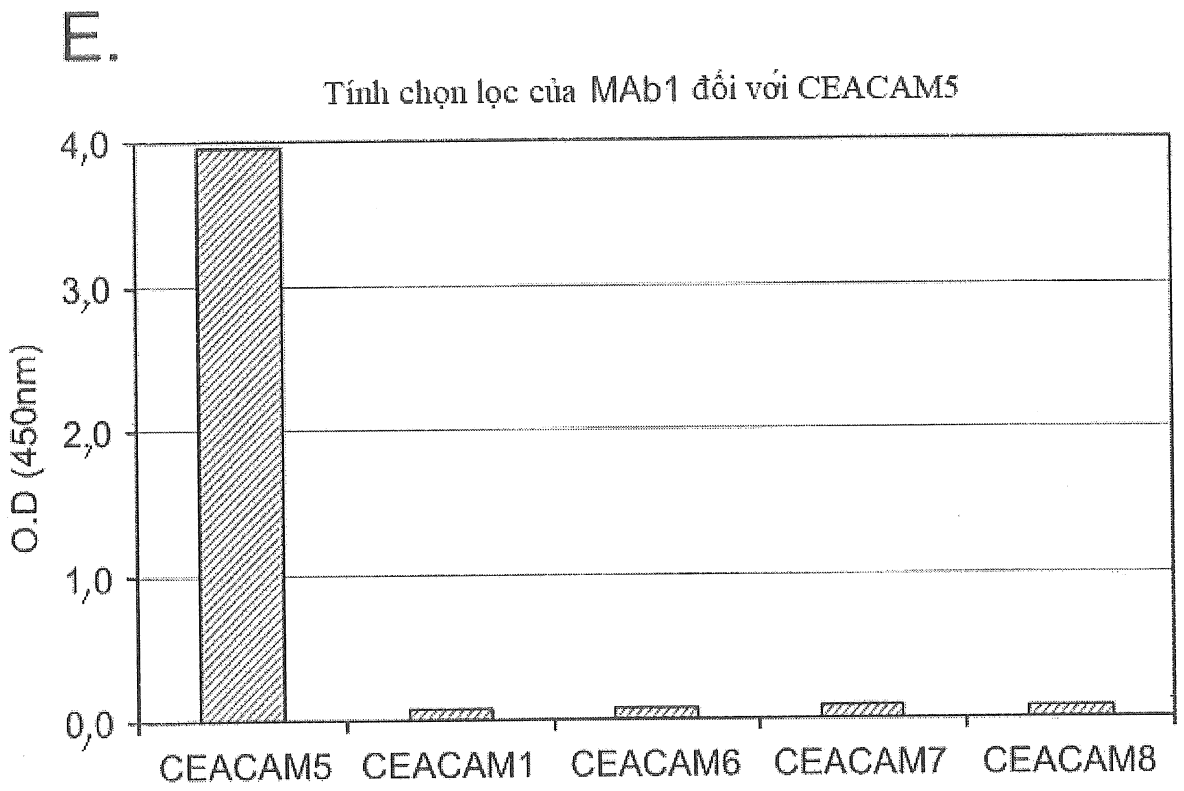
C.



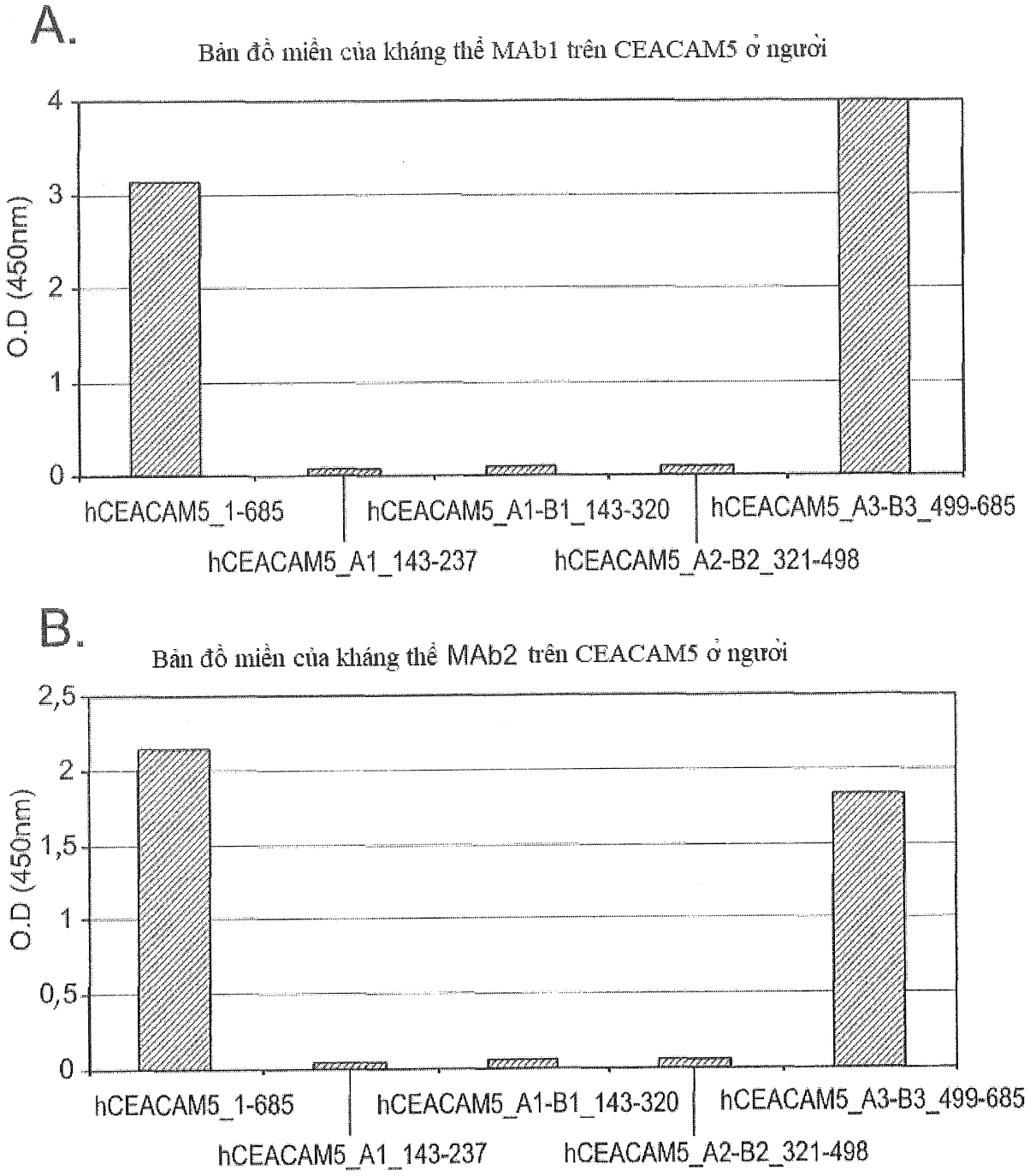
D.



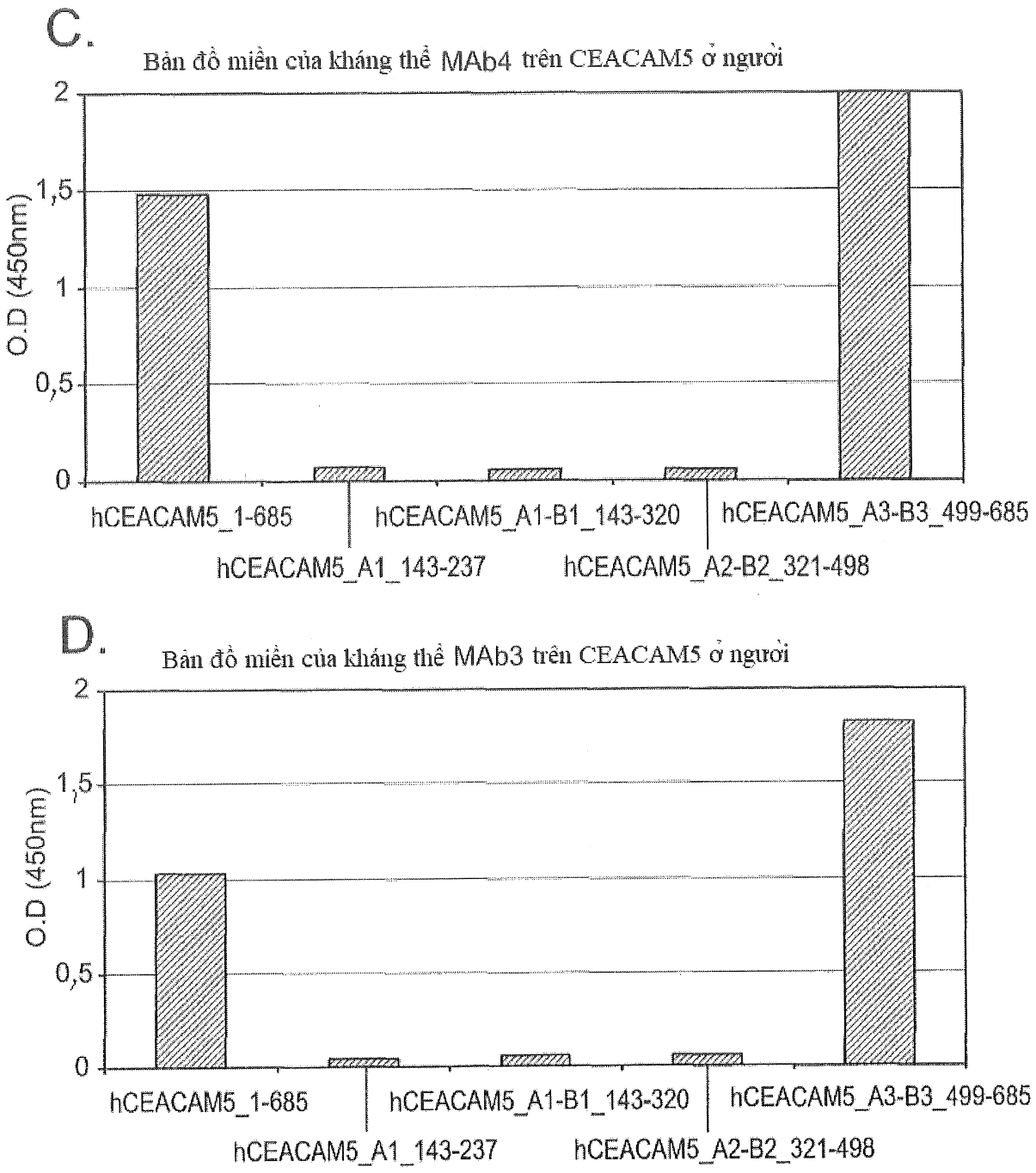
HÌNH 1: Tiếp theo



HÌNH 1: Kết thúc

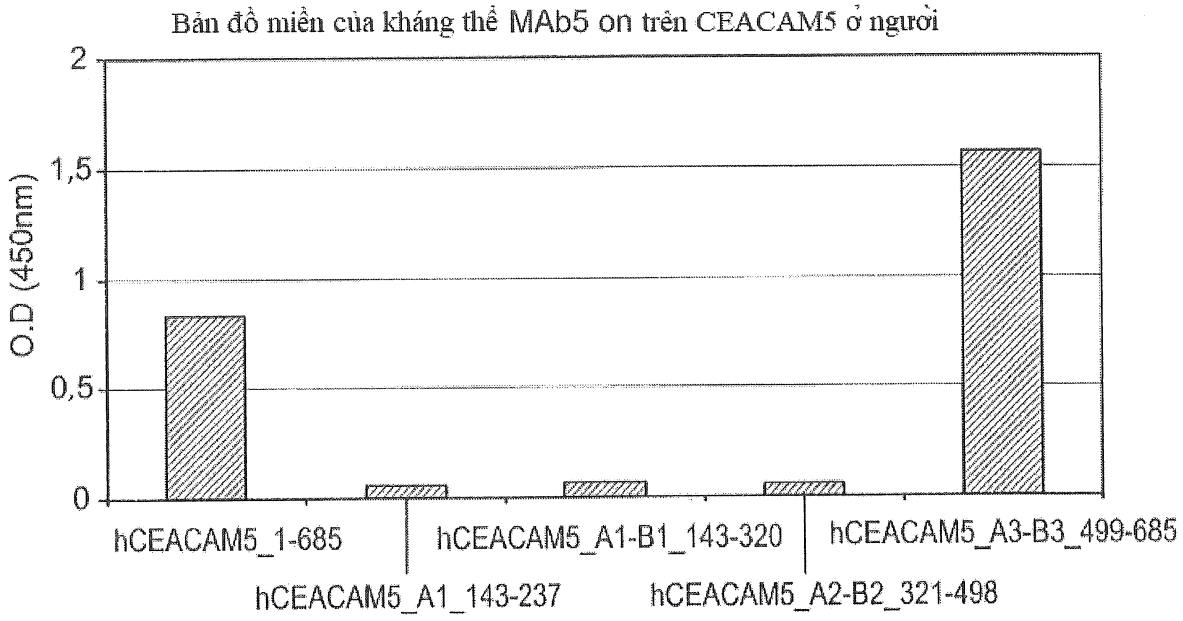


HÌNH 2: Bắt đầu

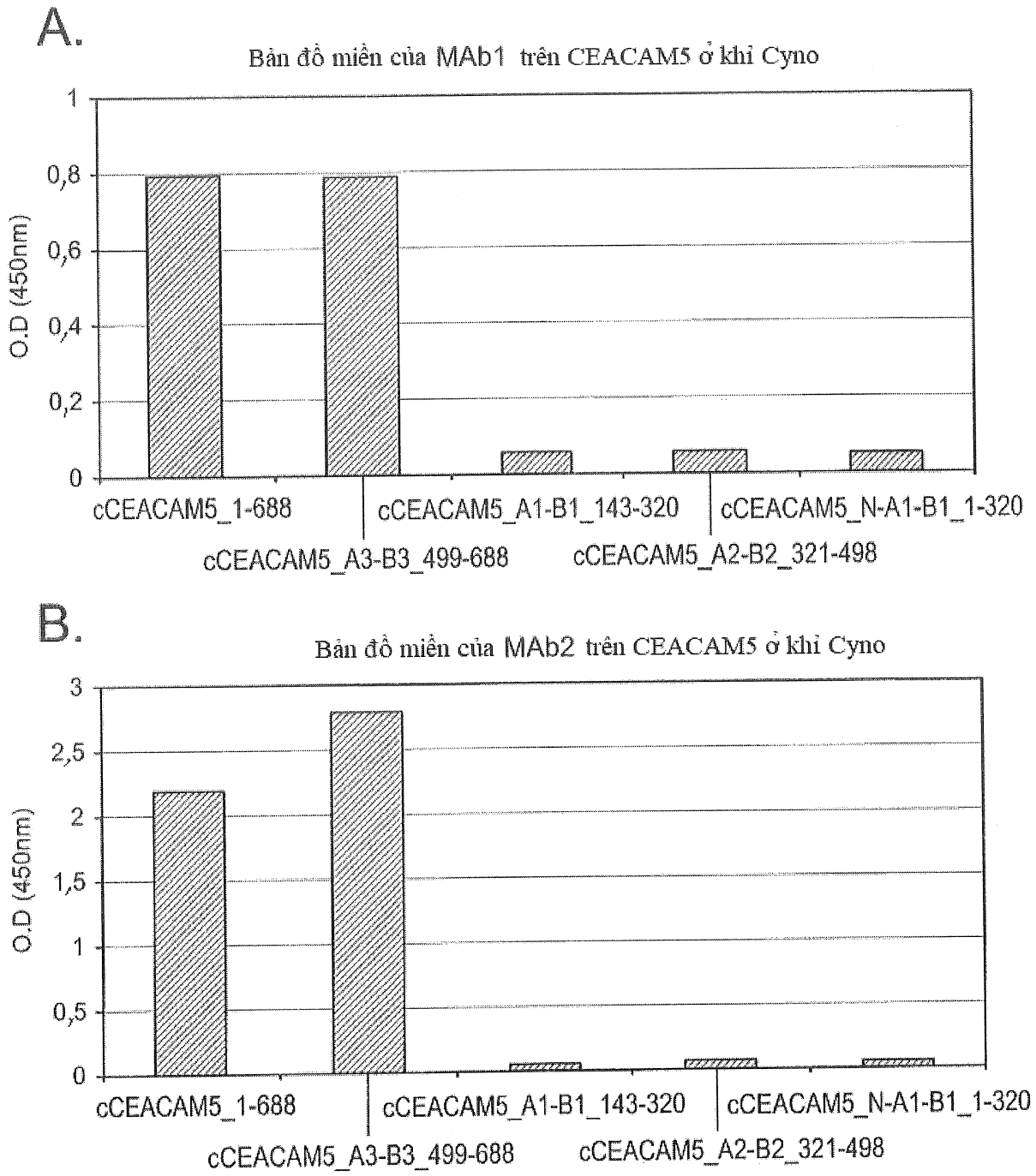


HÌNH 2: Tiếp theo

E.

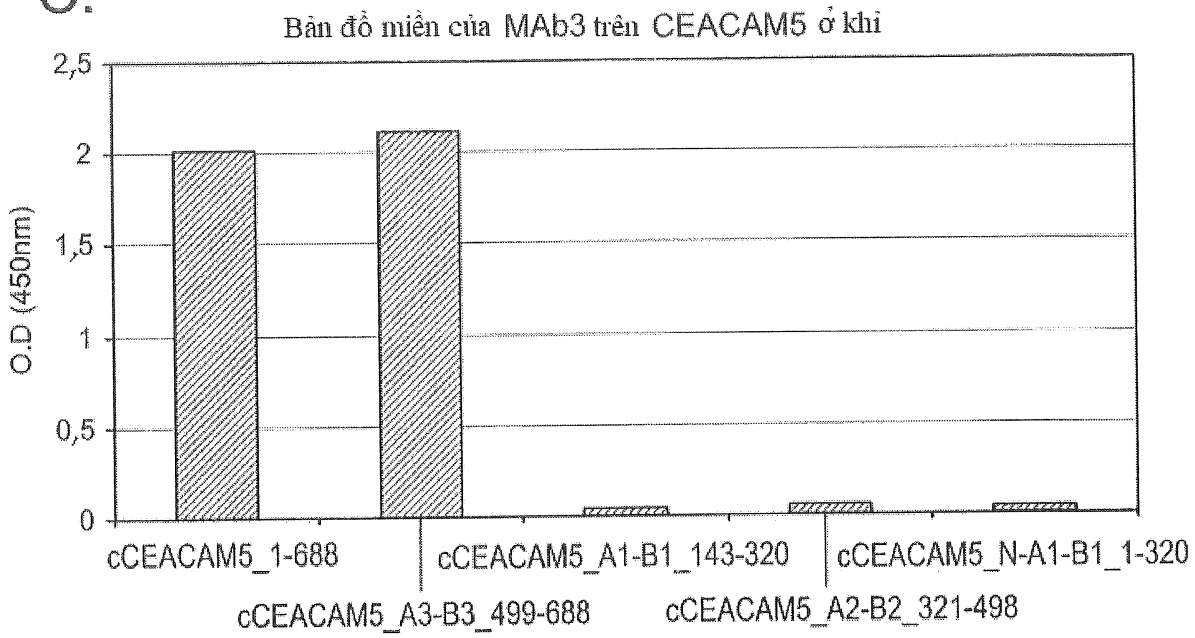


HÌNH 2: KẾT THÚC

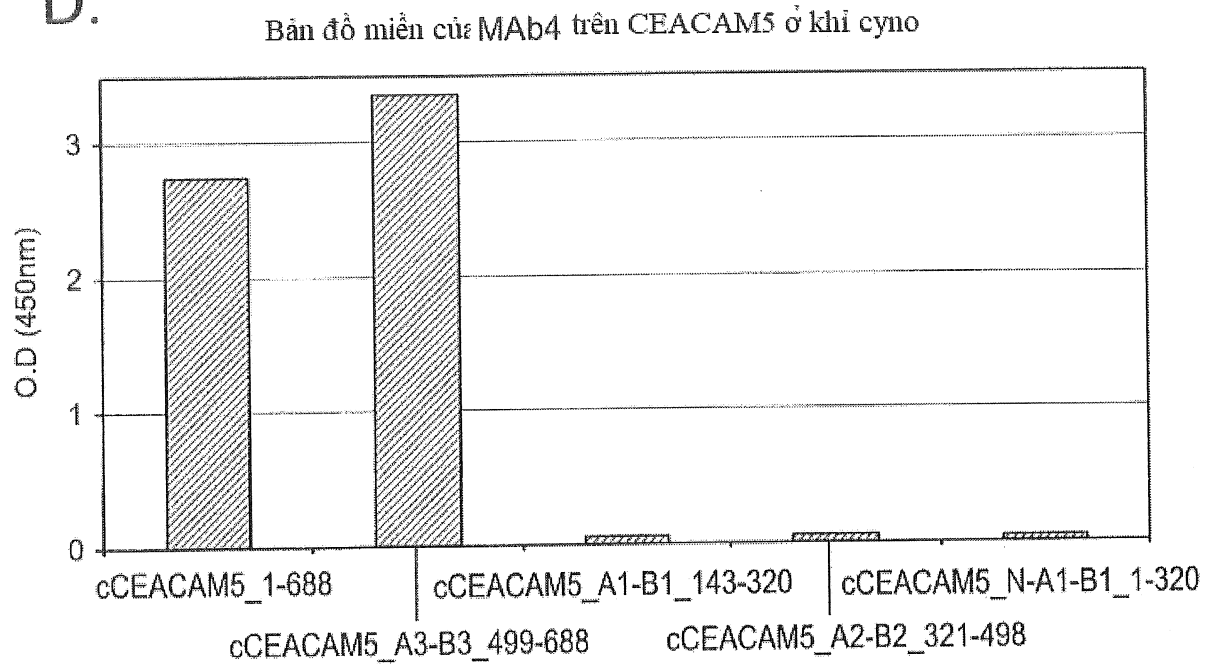


HÌNH 3: Bắt đầu

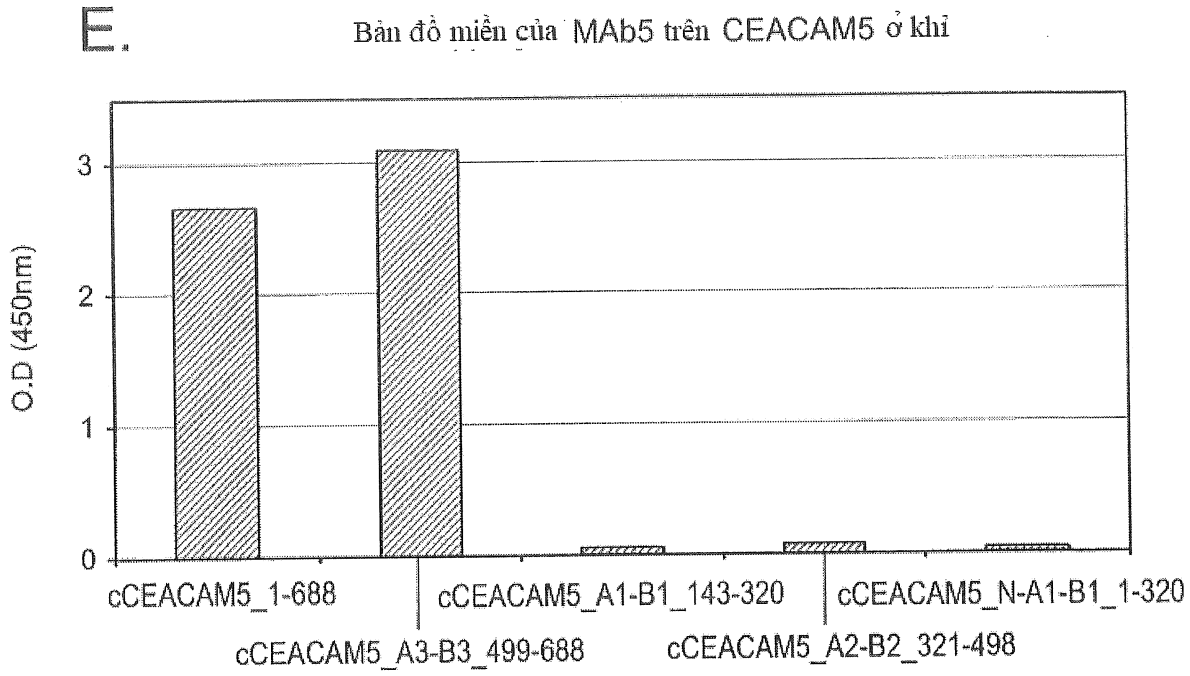
C.



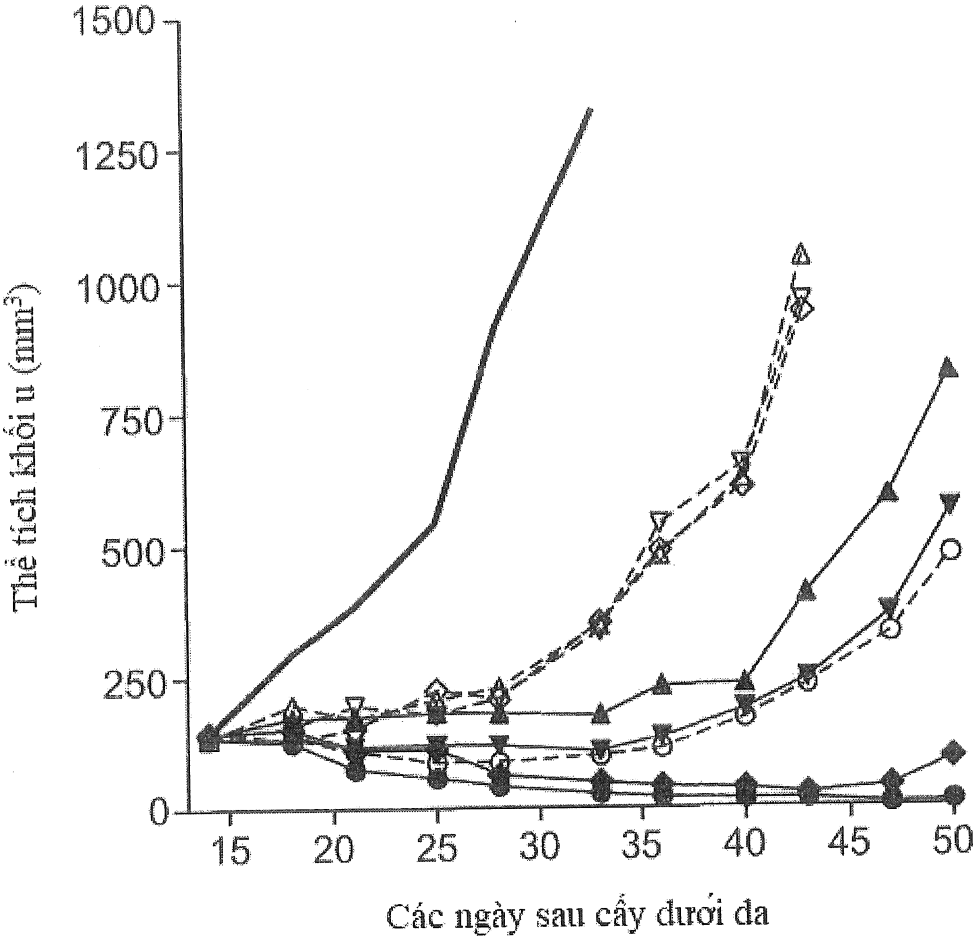
D.



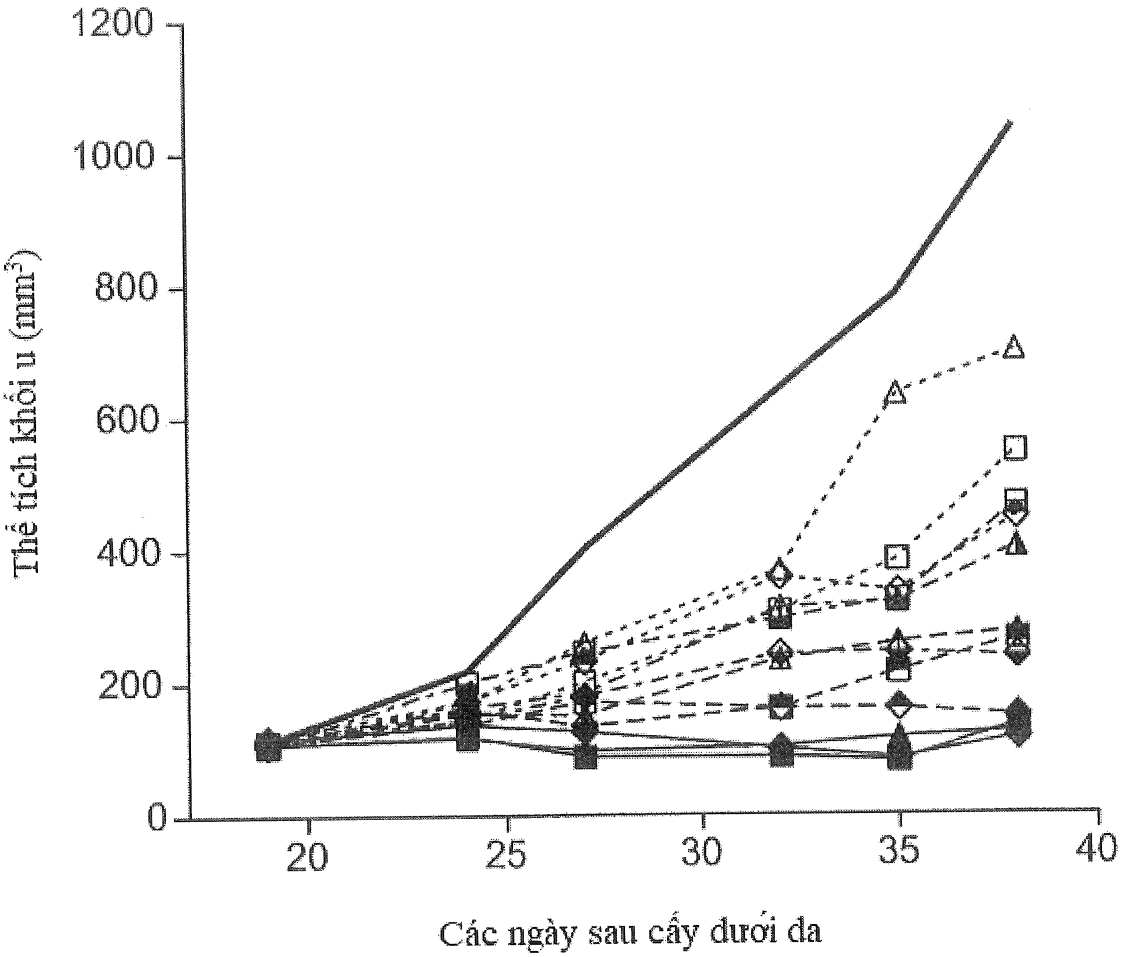
HÌNH 3: Tiếp theo



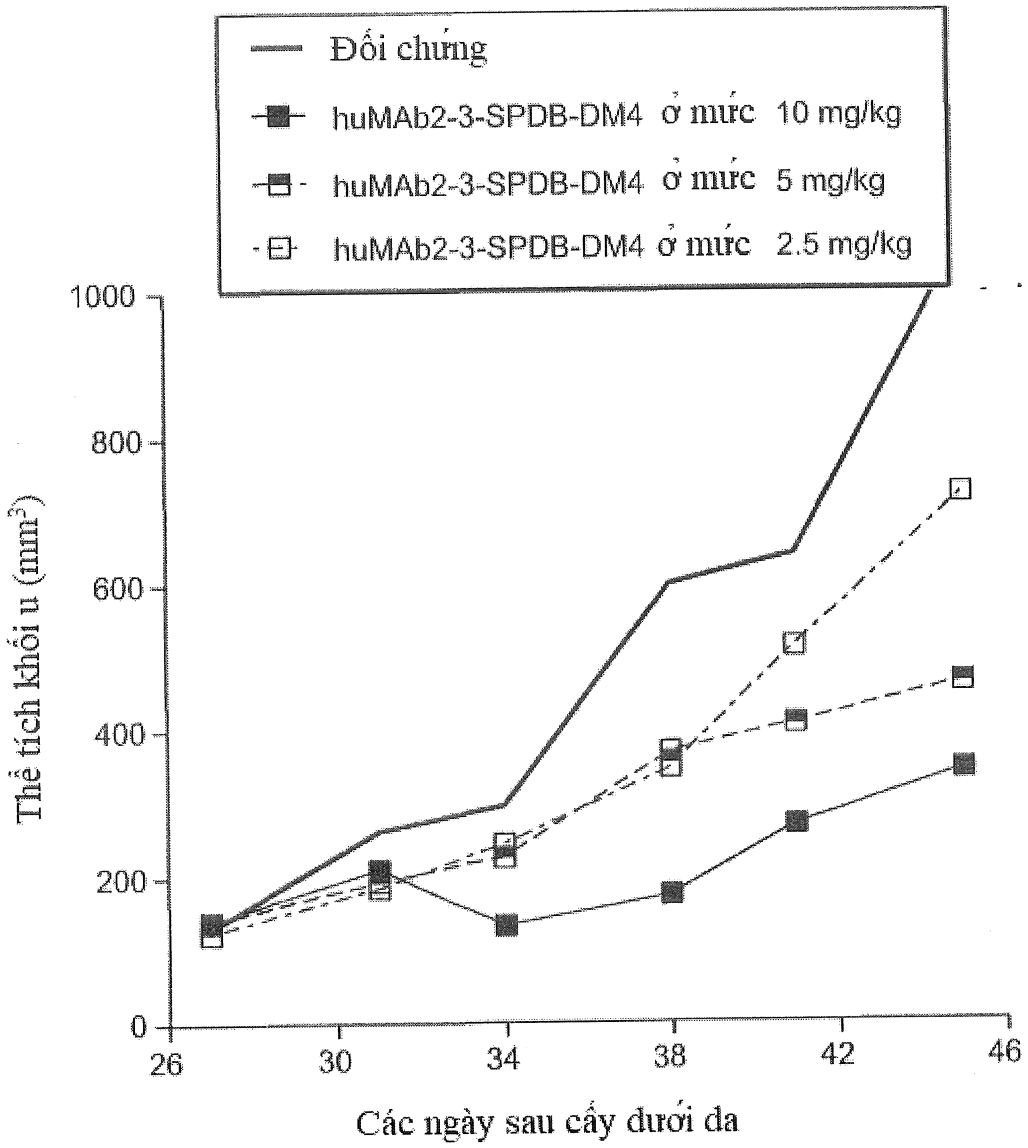
HÌNH 3: Kết thúc


1500
1250
1000
750
500
250
0
Thể tích khối u (mm³)
15
20
25
30
35
40
45
50
Các ngày sau cấy dưới da
Đối chứng
chMAb4-SPDB-DM4 ở mức 5 mg/kg
chMAb4-SPDB-DM4 ở mức 2,5 mg/kg
chMAb2-SPDB-DM4 ở mức 5 mg/kg
chMAb2-SPDB-DM4 ở mức 5 mg/kg
chMAb1-SPDB-DM4 ở mức 5 mg/kg
chMAb1-SPDB-DM4 ở mức 2,5 mg/kg
chMAb5-SPDB-DM4 ở mức 5 mg/kg
chMAb5-SPDB-DM4 ở mức 25 mg/kg

HÌNH 4


1200
1000
800
600
400
200
0
Thể tích khối u (mm³)
20
25
30
35
40
Các ngày sau cấy dưới da
Control
chMAb2-SPDB-DM4 ở mức 10mg/kg
chMAb2-SPDB-DM4 ở mức 5mg/kg
chMAb2-SPDB-DM4 ở mức 2,5mg/kg
chMAb2-SPDB-DM4 ở mức 1,25mg/kg
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 10mg/kg
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 5mg/kg
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 2,5mg/kg
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 1,25mg/kg
huMAb2-4-SPDB-DM4 ở mức 10mg/kg
huMAb2-4-SPDB-DM4 ở mức 5mg/kg
huMAb2-4-SPDB-DM4 ở mức 2,5mg/kg
huMAb2-4-SPDB-DM4 ở mức 1,25mg/kg

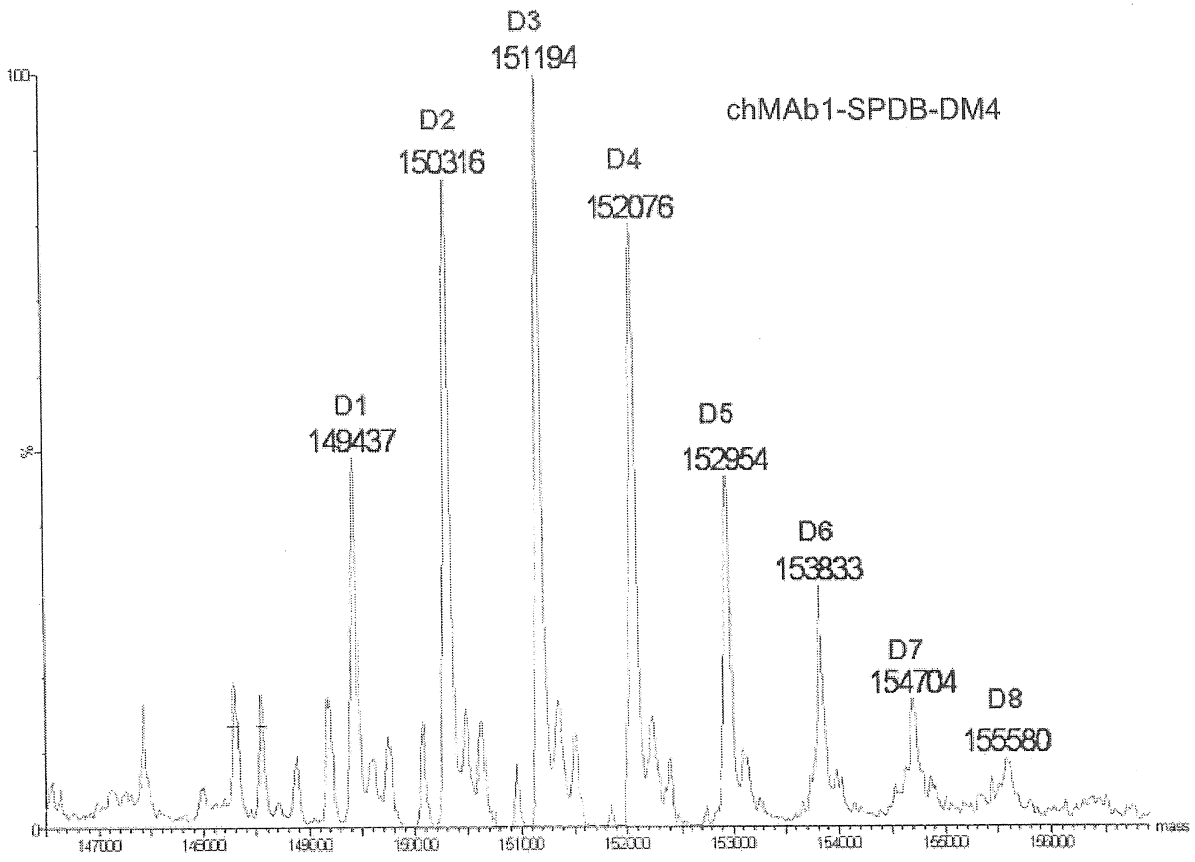
HÌNH 5


Đối chứng
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 10 mg/kg
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 5 mg/kg
huMAb2-3-SPDB-DM4 ở mức 2.5 mg/kg
Thể tích khối u (mm3)
1000
800
600
400
200
0
26
30
34
38
42
46
Các ngày sau cấy dưới da

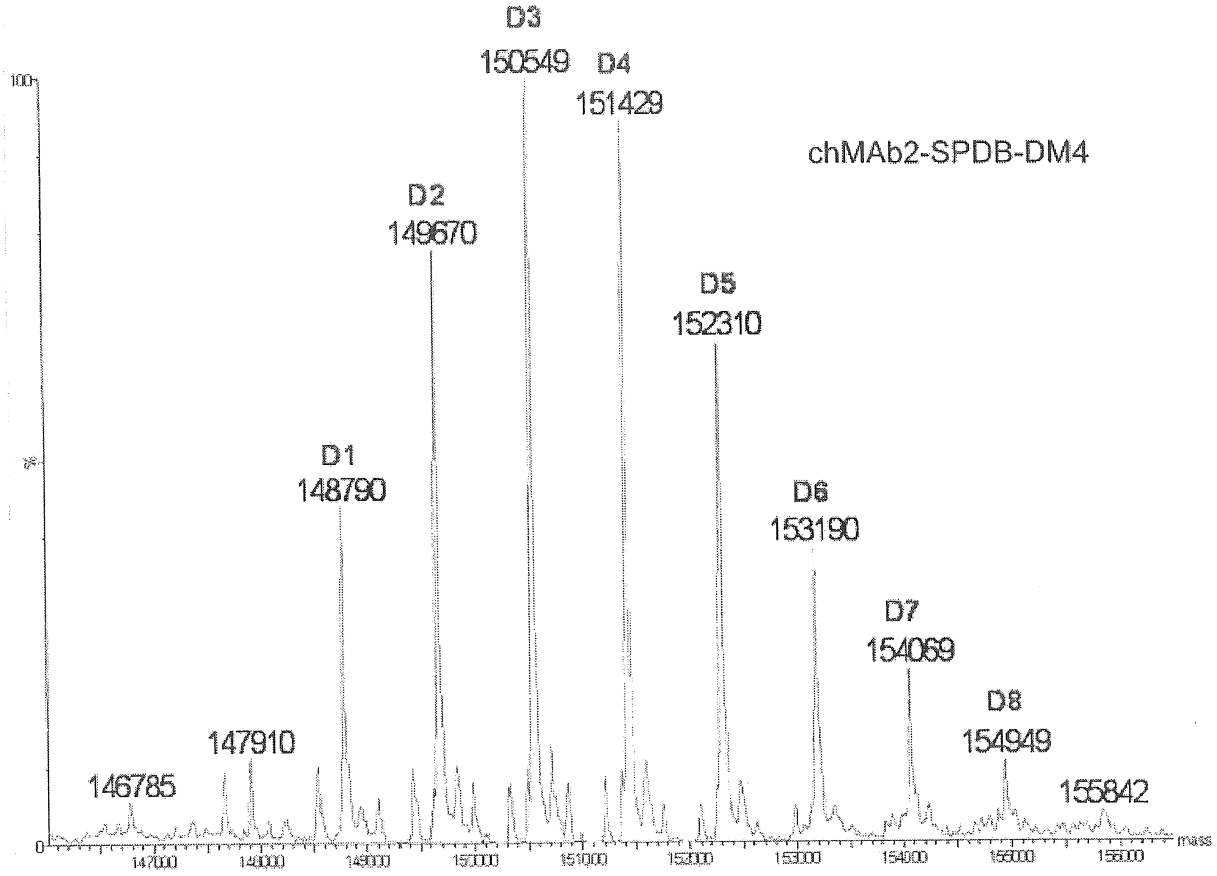
HÌNH 6

```
MAb3  VH   (1)   EVKLVESGGGLVKPGGSLTLPCAASGFTFSRYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGG-DTYY
MAb1  VH   (1)   EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYIYY
MAb4  VH   (1)   EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAFISSYGGRTYY
MAb5  VH   (1)   ELQLVESGGVLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVTYINSGGGITYY
MAb2  VH   (1)   EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGITYF

MAb3  VH   (60)  PDSVKGRFTVSRDNARNILFLQMSSLRSEDTGMYYCARVNYYDSSFLDWWGQGTTLTVSS
MAb1  VH   (61)  LDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARPAYYGNPAMDYWGQGTSVTVSS
MAb4  VH   (61)  ADTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMFYCAAHYFGTSGPFAYWGQGTLVTVSE
MAb5  VH   (61)  PDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCTAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA
MAb2  VH   (61)  PDTVQGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAIYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA

MAb3  VH   (1)   DIVMTQSQRFMSTLEGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPD
MAb1  VH   (1)   DILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSASYRYSGVPD
MAb4  VH   (1)   DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYFAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLAEGVPS
MAb5  VH   (1)   DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLIVYNAKTLTEGVPS
MAb2  VH   (1)   DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNTKTLAEGVPS

MAb3  VH   (61)  RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLYTFGGGTKLEIK
MAb1  VH   (61)  RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPITFGGGTKLEIK
MAb4  VH   (61)  RFSGSGSGTQFSIKINSLQPEDFGTYYCQHHYGIP--FTFGSGTKLELK
MAb5  VH   (61)  RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTP--FTFGSGTKLEIK
MAb2  VH   (61)  RFSGSGSGTQFSIKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTP--FTFGSGTKLEIK
```

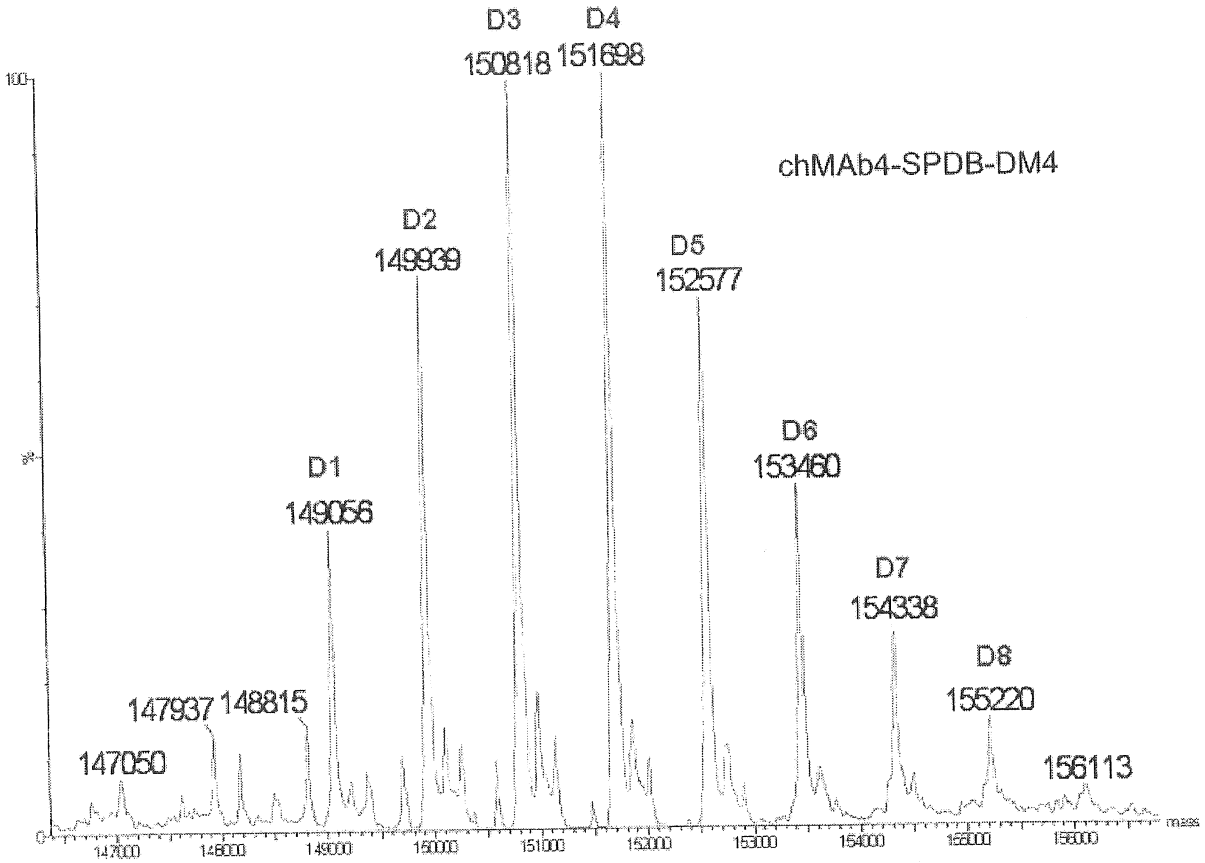
HÌNH 7


D3
151194
chMAb1-SPDB-DM4
D2
150316
D4
152076
D1
149437
D5
152954
D6
153833
D7
154704
D8
155580
100
%
0
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000
156000
mass

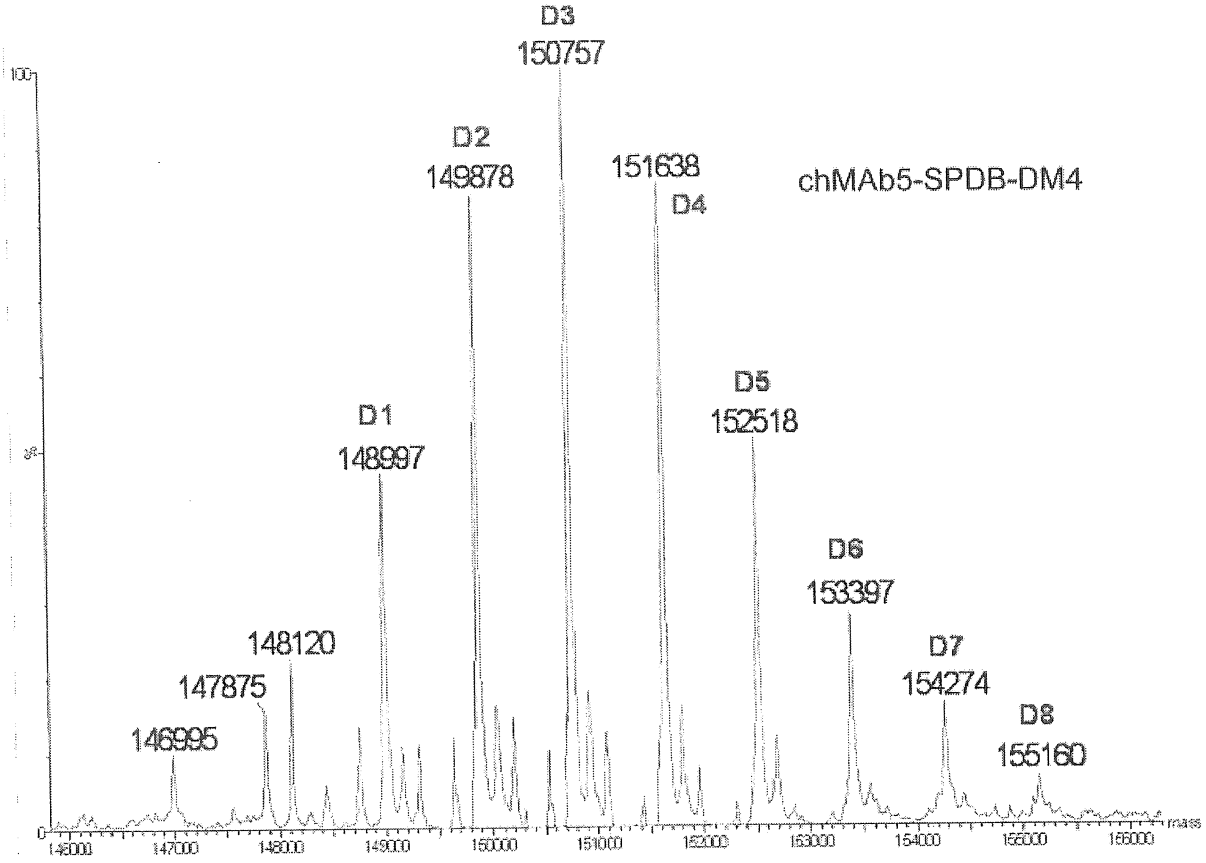
HÌNH 8


D3
150549
D4
151429
chMAb2-SPDB-DM4
D2
149670
D5
152310
D1
148790
D6
153190
D7
154069
D8
154949
147910
146785
155842
100
%
0
mass
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000
156000

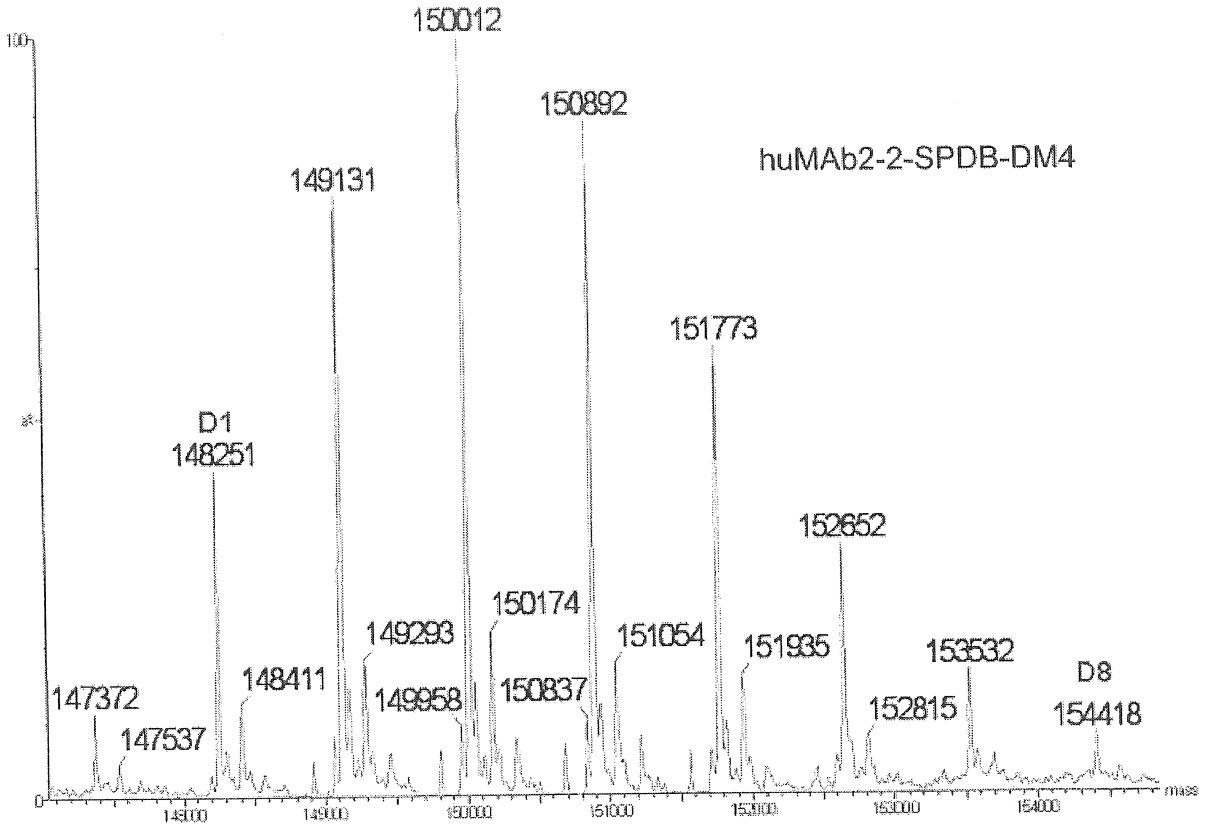
HÌNH 9


chMAb4-SPDB-DM4
D1
149056
D2
149939
D3
150818
D4
151698
D5
152577
D6
153460
D7
154338
D8
155220
147050
147937
148815
156113
%
100
0
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000
156000

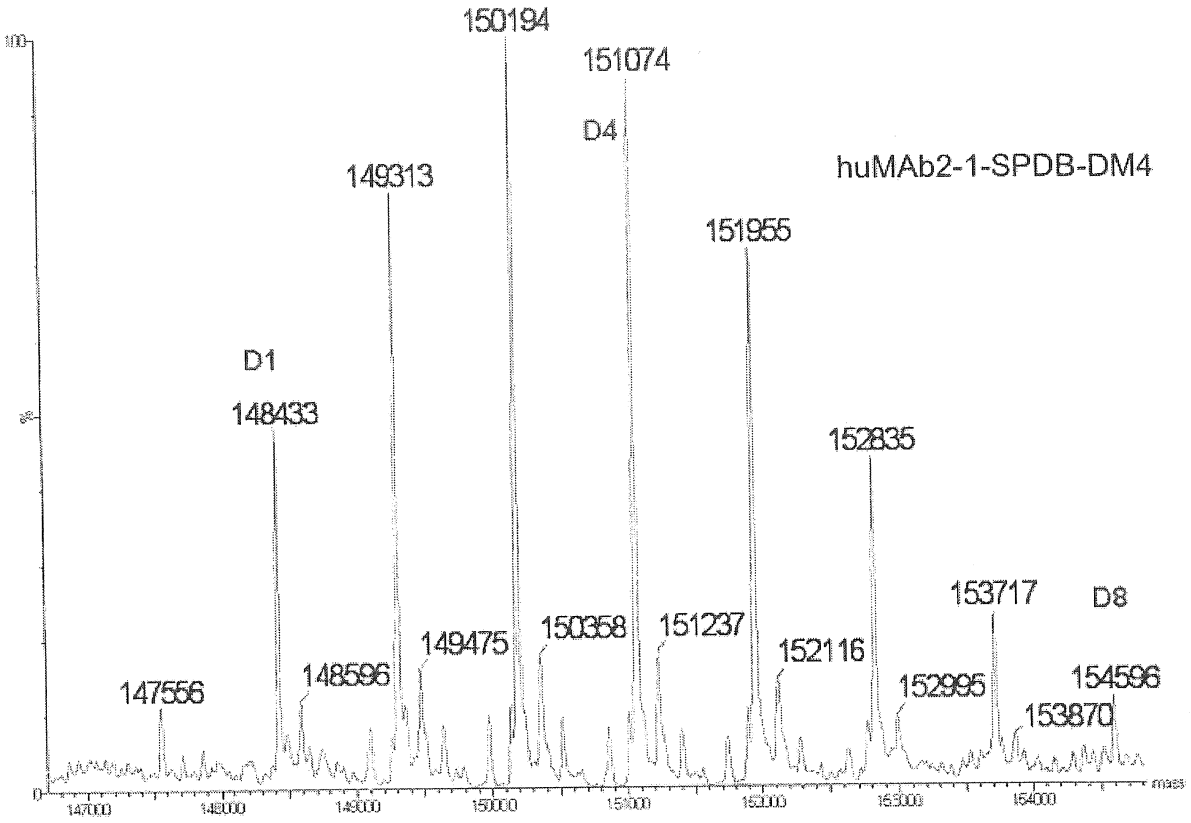
HÌNH 10


D3
150757
D2
149878
151638
D4
chMAb5-SPDB-DM4
D5
152518
D1
148997
D6
153397
148120
147875
D7
154274
D8
155160
146995
100
%
0
148000
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000
156000
mass

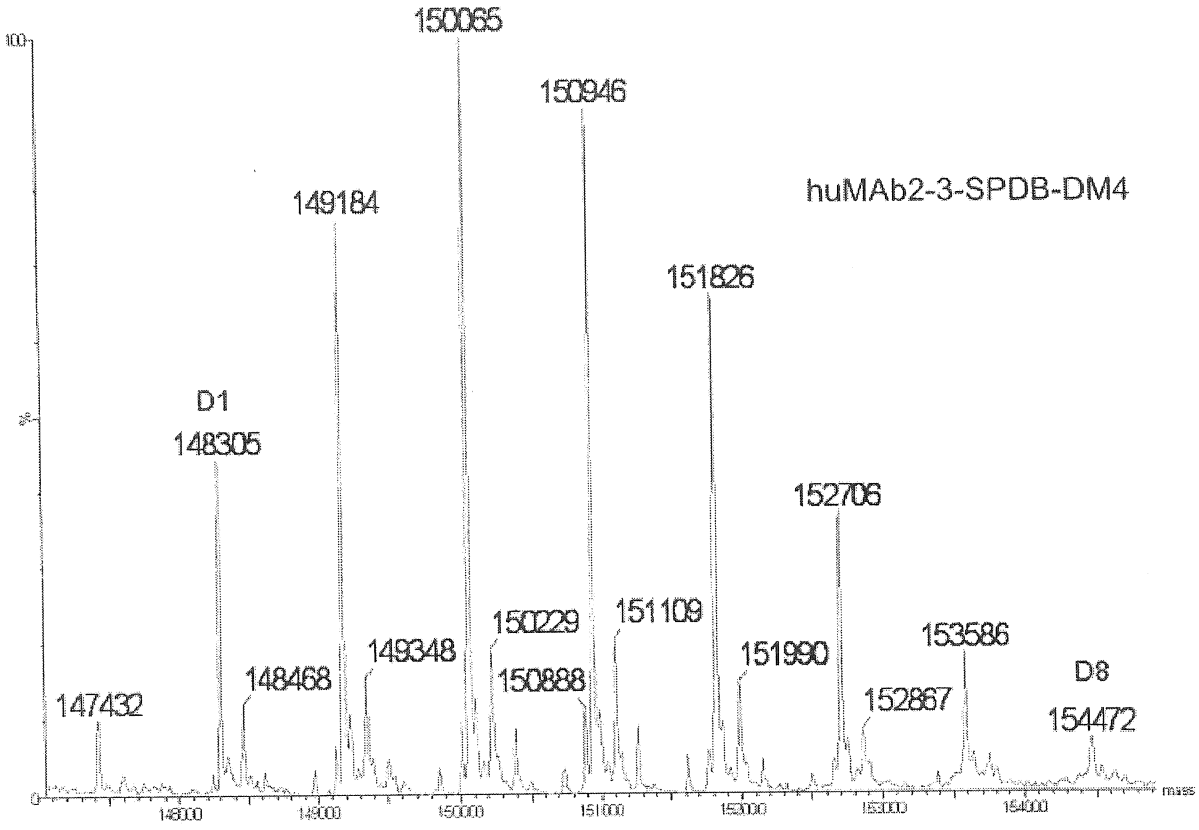
HÌNH 11


150012
150892
149131
huMAb2-2-SPDB-DM4
151773
D1
148251
152652
150174
149293
151054
151935
153532
D8
148411
147372
149958
150837
152815
154418
147537
mass

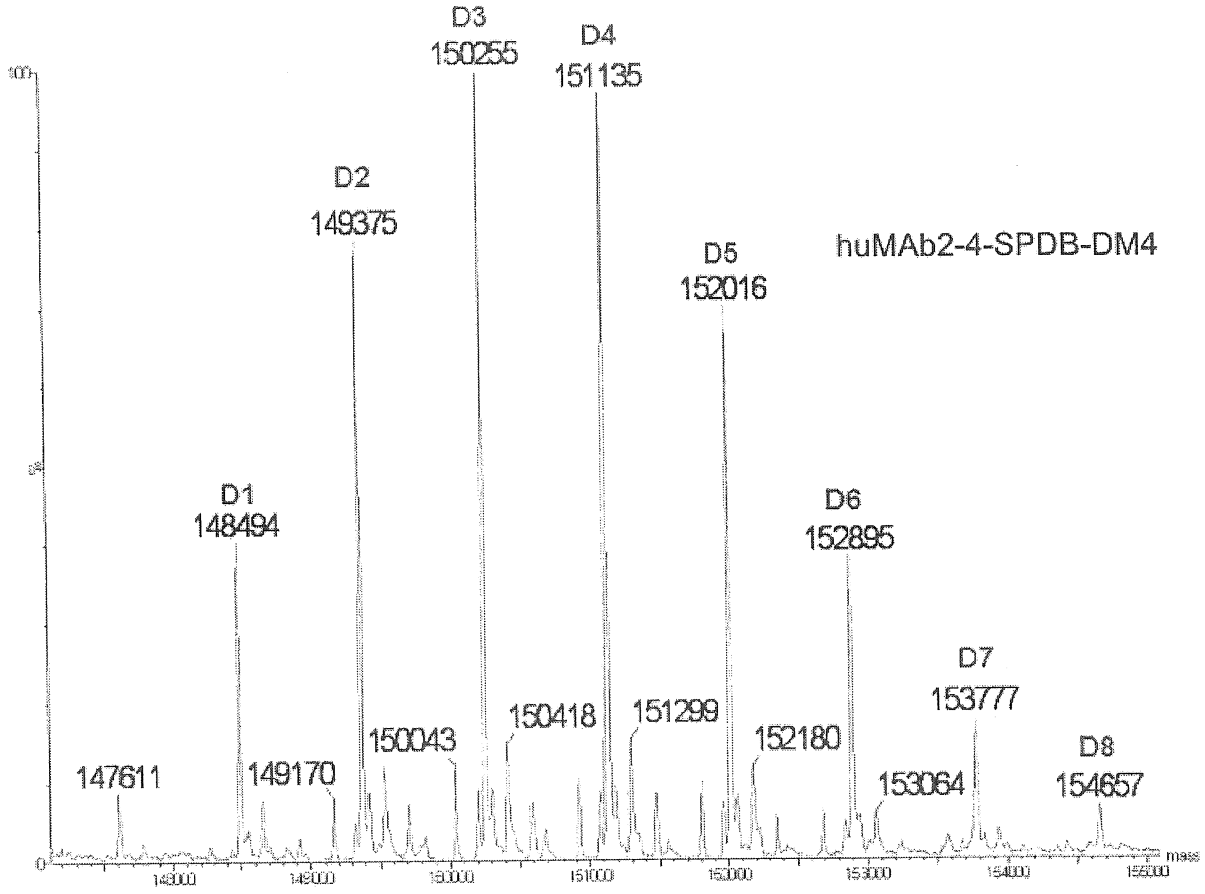
HÌNH 12


150194
151074
D4
149313
huMAb2-1-SPDB-DM4
151955
D1
148433
152835
153717
D8
149475
150358
151237
152116
154596
147556
148596
152995
153870
100
%
0
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
mass

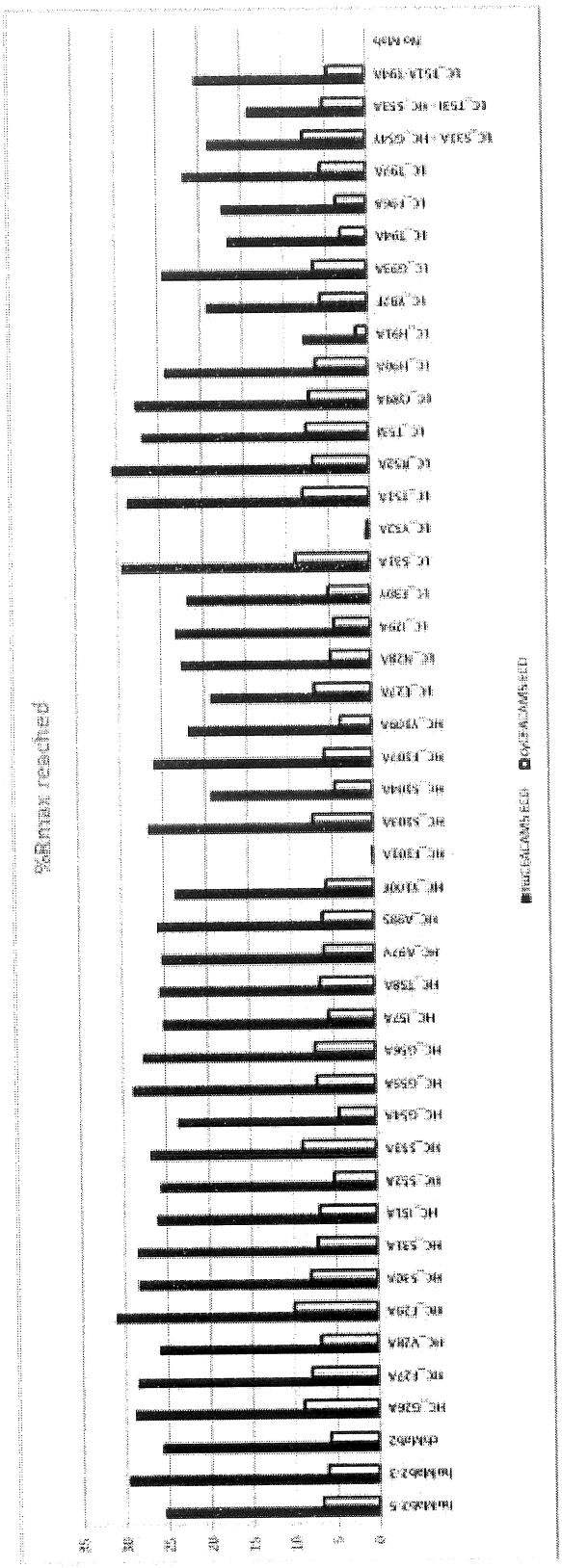
HÌNH 13


150065
150946
149184
huMAb2-3-SPDB-DM4
151826
D1
148305
152706
150229
151109
153586
149348
151990
148468
150888
D8
147432
152867
154472
100
%
0
mass
148000
149000
150000
151000
153000
154000

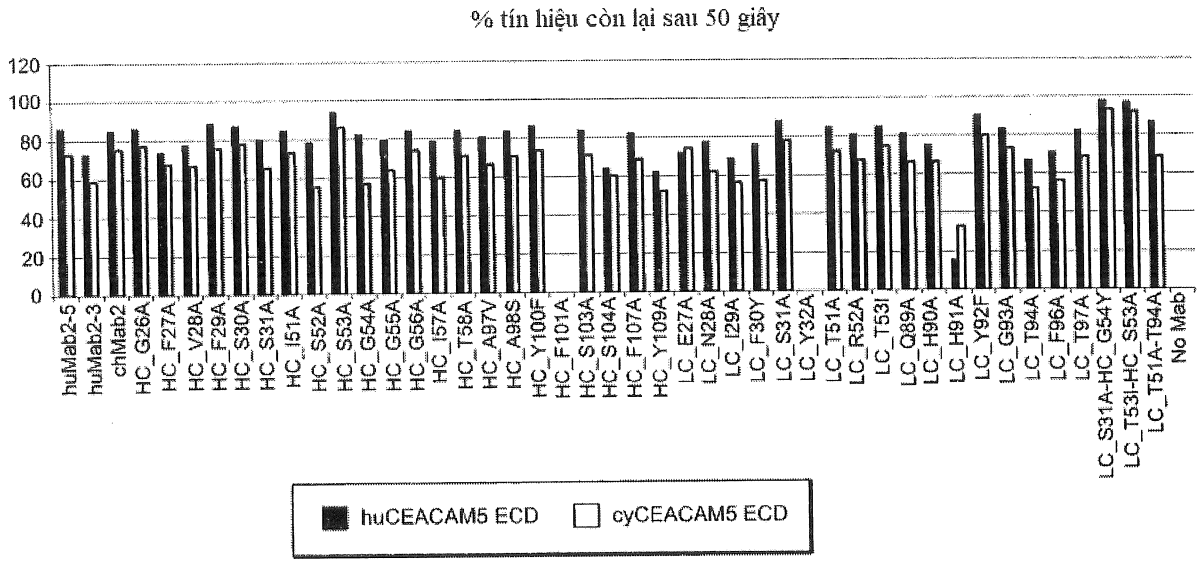
HÌNH 14


D3
150255
D4
151135
D2
149375
D5
152016
huMAb2-4-SPDB-DM4
D1
148494
D6
152895
D7
153777
150418
151299
150043
152180
D8
154657
147611
149170
153064
100
%
0
mass
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000
155000

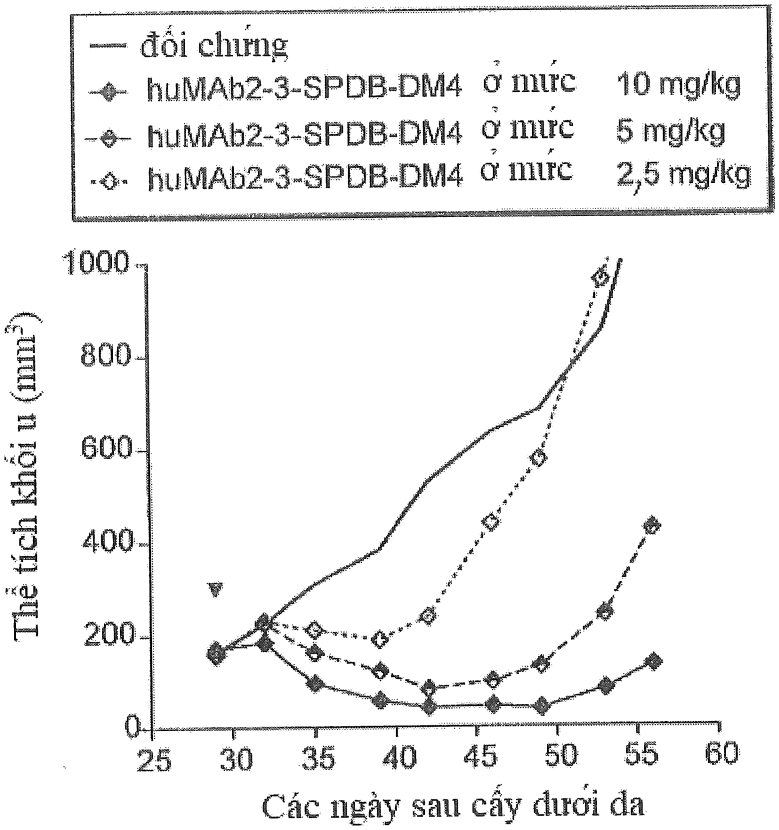
HÌNH 15



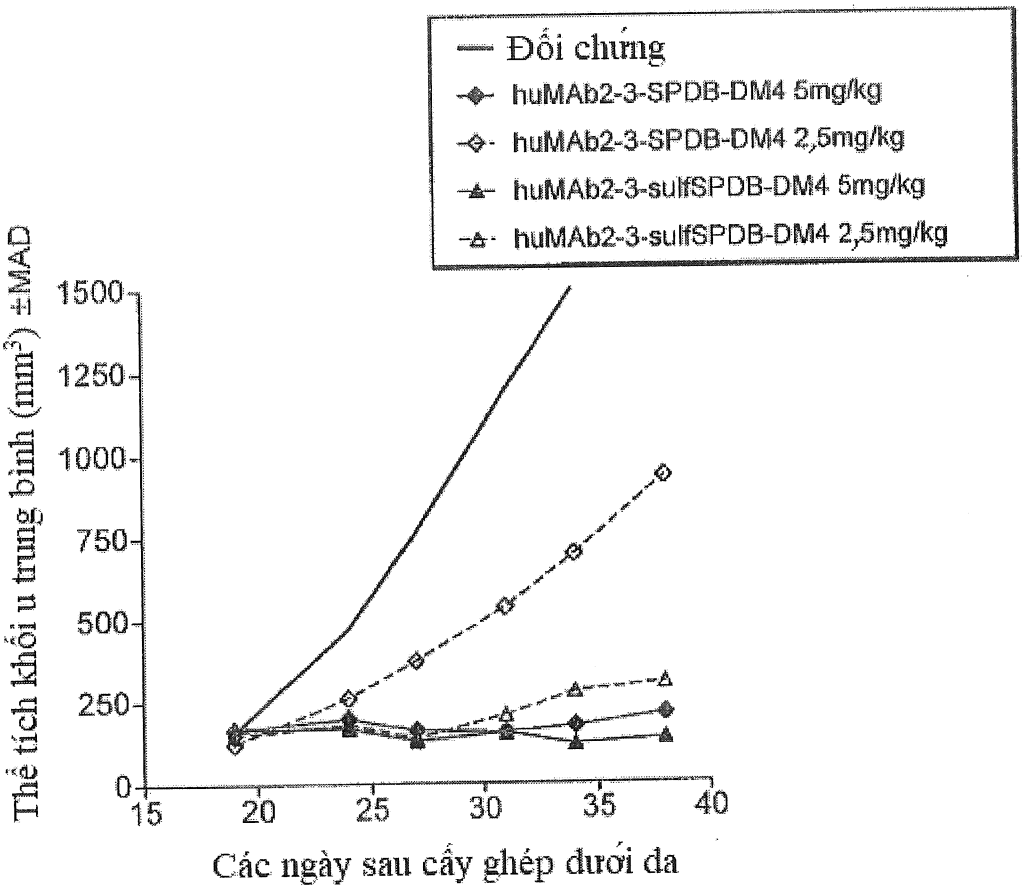
HÌNH 16


% tín hiệu còn lại sau 50 giây
120
100
80
60
40
20
0
huMab2-5
huMab2-3
chMab2
HC_G26A
HC_F27A
HC_V28A
HC_F29A
HC_S30A
HC_S31A
HC_I51A
HC_S52A
HC_S53A
HC_G54A
HC_G55A
HC_G56A
HC_I57A
HC_T58A
HC_A97V
HC_A98S
HC_Y100F
HC_F101A
HC_S103A
HC_S104A
HC_F107A
HC_Y109A
LC_E27A
LC_N28A
LC_I29A
LC_F30Y
LC_S31A
LC_Y32A
LC_T51A
LC_R52A
LC_T53I
LC_Q89A
LC_H90A
LC_H91A
LC_Y92F
LC_G93A
LC_T94A
LC_F96A
LC_T97A
LC_S31A-HC_G54Y
LC_T53I-HC_S53A
LC_T51A-T94A
No Mab
huCEACAM5 ECD
cyCEACAM5 ECD

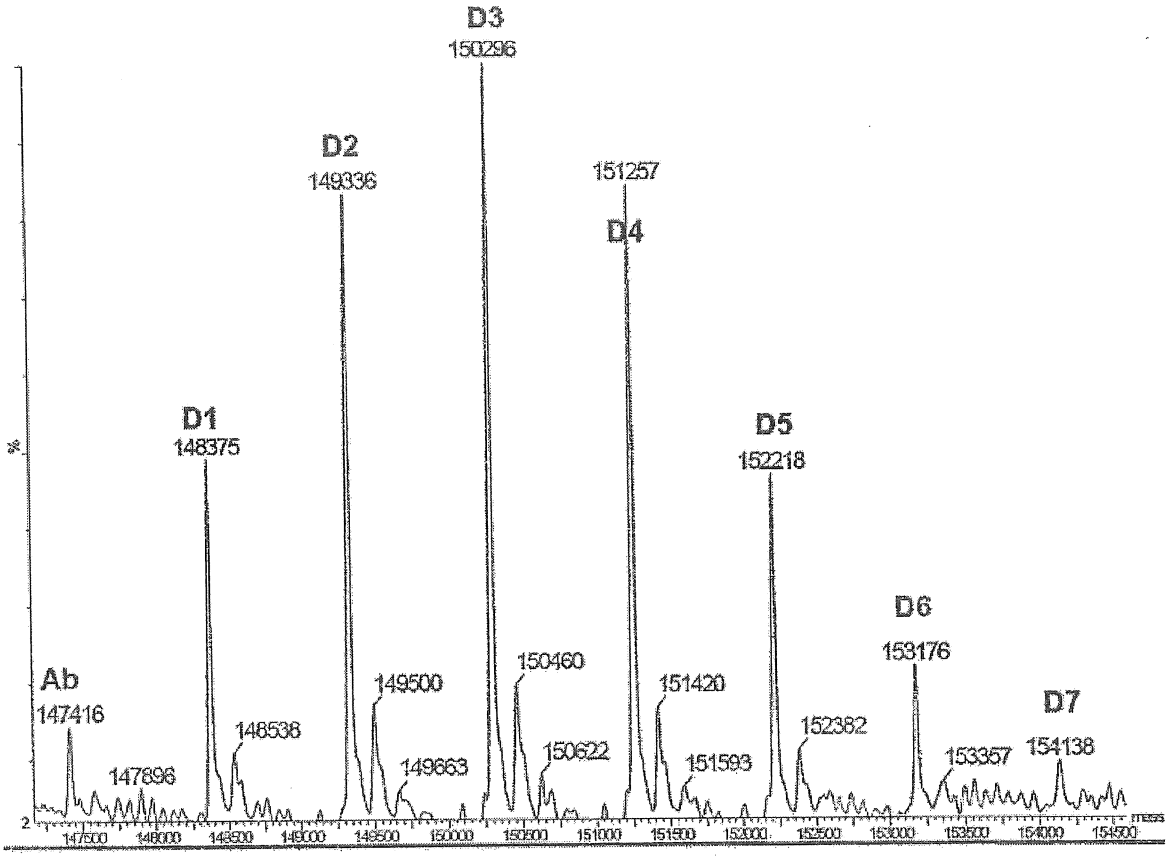
HÌNH 17



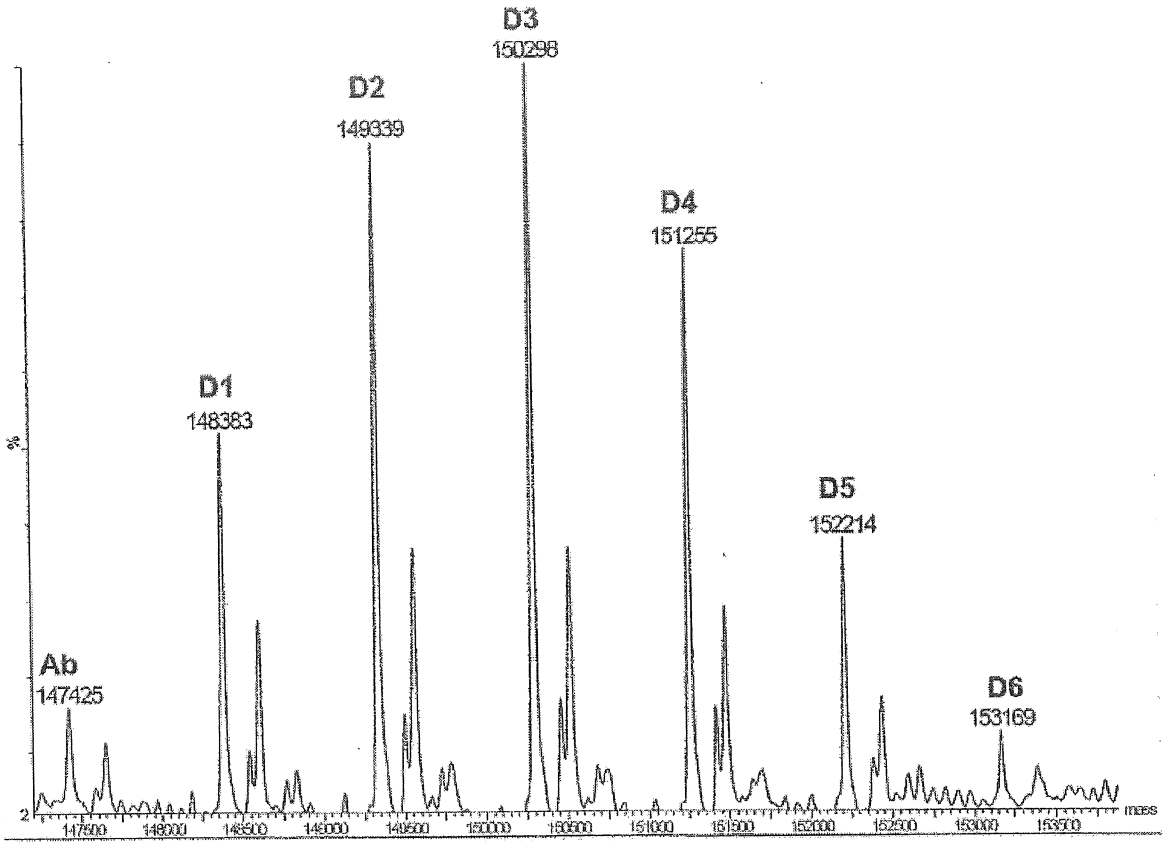
HÌNH 18



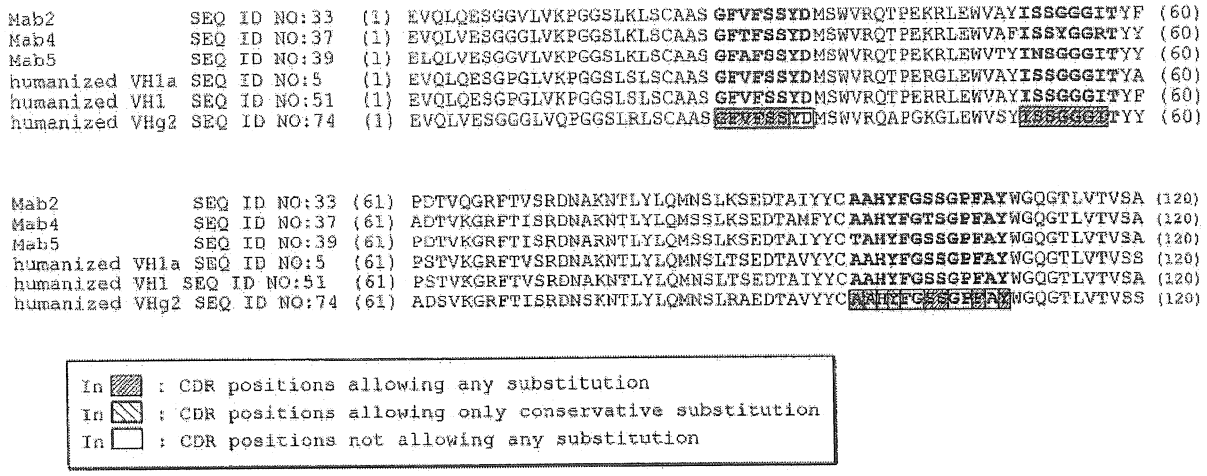
HÌNH 19


D3
150296
D2
149336
151257
D4
D1
148375
D5
152218
D6
153176
Ab
147416
150460
149500
151420
D7
154138
148538
152382
147896
150622
149663
151593
153357
%
2
147500
148000
148500
149000
149500
150000
150500
151000
151500
152000
152500
153000
153500
154000
154500

HÌNH 20


D3
150298
D2
149339
D4
151255
D1
148383
D5
152214
Ab
147425
D6
153169
%
mass

HÌNH 21


Mab2 SEQ ID NO:33 (1) EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS GFVFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGITYF (60)
Mab4 SEQ ID NO:37 (1) EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS GFTFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAFISSYGGRTYY (60)
Mab5 SEQ ID NO:39 (1) ELQLVESGGVLVKPGGSLKLSCAAS GFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVTYINSGGGITYY (60)
humanized VH1a SEQ ID NO:5 (1) EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAAS GFVFSSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA (60)
humanized VH1 SEQ ID NO:51 (1) EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAAS GFVFSSYDMSWVRQTPERRLEWVAYISSGGGITYF (60)
humanized VHg2 SEQ ID NO:74 (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFVFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSYISSGGGITYY (60)
Mab2 SEQ ID NO:33 (61) PDTVQGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAIYYC AAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA (120)
Mab4 SEQ ID NO:37 (61) ADTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMFYC AAHYFGTSGPFAYWGQGTLVTVSA (120)
Mab5 SEQ ID NO:39 (61) PDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAIYYC TAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA (120)
humanized VH1a SEQ ID NO:5 (61) PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYC AAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSS (120)
humanized VH1 SEQ ID NO:51 (61) PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAIYYC AAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSA (120)
humanized VHg2 SEQ ID NO:74 (61) ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSS (120)
In : CDR positions allowing any substitution
In : CDR positions allowing only conservative substitution
In : CDR positions not allowing any substitution

HÌNH 22

```
Mab2              SEQ ID NO:34  (1)DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNTKTLAEGVPS (60)
Mab4              SEQ ID NO:38  (1)DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYFAWYQQKQGKSPQLLVYNAKILAEGVPS (60)
Mab5              SEQ ID NO:40  (1)DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLTEGVPS (60)
humanized VL1     SEQ ID NO:17  (1)DIQMTQSPASLSASVGDTVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS (60)
humanized VL1a    SEQ ID NO:23  (1)DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS (60)
humanized VL1c    SEQ ID NO:29  (1)DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS (60)
humanized VL1d    SEQ ID NO:55  (1)DIQMTQSPASLSASVGDTVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS (60)
humanized VLg5    SEQ ID NO:75  (1)DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNTRTLQSGVPS (60)

Mab2              SEQ ID NO:34  (61)RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (107)
Mab4              SEQ ID NO:38  (61)RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYYCQHHYGIPFTFGSGTKLELK (107)
Mab5              SEQ ID NO:40  (61)RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (107)
humanized VL1     SEQ ID NO:17  (61)RFSGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (107)
humanized VL1a    SEQ ID NO:23  (61)RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (107)
humanized VL1c    SEQ ID NO:29  (61)RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (107)
humanized VL1d    SEQ ID NO:55  (61)RFSGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (107)
humanized VLg5    SEQ ID NO:75  (61)RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGQGTKLEIK (107)
```

In ▨ : CDR positions allowing any substitution
In ▧ : CDR positions allowing only conservative substitution
In □ : CDR positions not allowing any substitution

HÌNH 23

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SANOFI

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH

<130> FR2012/065

<150> EP12306444
<151> 2012-11-20

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 2

Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile
1 5

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 3

Ala Arg Pro Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 4

Gln Asn Val Gly Thr Asn
1 5

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH1a của kháng thể được nhân hoá MAb2

<400> 5

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 7

Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 8

Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 9
<211> 13
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 9

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 10

Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
1 5

<210> 11
<211> 526
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 11

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

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser

85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
245 250 255

Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
260 265 270

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
290 295 300

Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
305 310 315 320

Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
325 330 335

Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
340 345 350

Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
355 360 365

Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
370 375 380

Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
385 390 395 400

Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
405 410 415

Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
420 425 430

Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
435 440 445

Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
450 455 460

Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
465 470 475 480

Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
485 490 495

Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
500 505 510

Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
515 520 525

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 12

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 14

Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr
1 5

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 15

Ala Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp
1 5 10

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 16

Gln Asn Val Gly Thr Asn
1 5

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> VL1 cu̇a kha´ng thê̇ đươ.c nhân hoa´ MAb2

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 18

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 20

Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 21

Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 22

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> VH1a cu̇a kha´ng thê̇ đươ.c nhân hoa´ MAb2

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 24

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 25

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 26

Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<400> 27

Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 28

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> VH1a cu̇a kha´ng thê̇ được nhân hoa´ MAb2

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 30

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 31

Glu Val Met Leu Val 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 Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 32

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 33

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 35

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể
<400> 37

Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 38

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

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

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

Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 39

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 41

Glu Val Met Leu Val 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 Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro 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

<210> 42
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 42

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 43
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 43

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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

<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 44

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 45
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 45

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 46
<211> 215
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 47
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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

<210> 48
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 48

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

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

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 49
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 49

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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

<210> 50
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 50

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn kháng thể

<400> 51

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Ser Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 52
<211> 702
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 52

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
195 200 205

Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
210 215 220

Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
290 295 300

Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
325 330 335

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

340 345 350

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
355 360 365

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
370 375 380

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser
385 390 395 400

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
405 410 415

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
435 440 445

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
450 455 460

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
465 470 475 480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
485 490 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545 550 555 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

<210> 53
<211> 654
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<400> 53

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
35 40 45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
50 55 60

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

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

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr

245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu
275 280 285

Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys
290 295 300

Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
305 310 315 320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu
325 330 335

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn
340 345 350

Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg
355 360 365

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
370 375 380

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn
385 390 395 400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe
405 410 415

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
420 425 430

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
435 440 445

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val
450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr
485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg
500 505 510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
515 520 525

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser
530 535 540

Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp
545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn
565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
580 585 590

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595 600 605

Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val
625 630 635 640

Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala
645 650

<210> 54
<211> 214
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> kháng thể

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 55
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> kháng thể

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

<210> 56
<211> 418
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>

<221> MIỀN
<222> (1)..(394)
<223> miền ngoại bào của CEACAM1 ở người

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN HỢP
<222> (395)..(418)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 56

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr
260 265 270

Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser
275 280 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
370 375 380

Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
385 390 395 400

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His
405 410 415

His His

<210> 57
<211> 418
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(394)
<223> miê`n ngoại bào của CEACAM1 ở khỉ cynomolgus

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (395)..(418)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 57

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Ser Gln Asn Leu Ile Gly Tyr Asn
20 25 30

Trp His Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Lys Arg Leu Ile Val Ala Tyr
35 40 45

Val Ile Glu Thr Lys Gln Thr Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Met Ile Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

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

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Asn Ile Thr Ile Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Val
115 120 125

Val Thr Phe Thr Cys Glu Ser Glu Ala Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Ser Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Lys Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Leu Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Cys Ser Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn
225 230 235 240

Glu Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr
260 265 270

Gly Arg Asn Arg Thr Thr Val Lys Met Ile Ile Val Ser Glu Gln Ser
275 280 285

Leu Val Val Ala Gln Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
290 295 300

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

Ile Ser Ile Ser Trp Phe Phe Lys Asp Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Asp Asn Ala Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Val Phe Asn Leu Ile
355 360 365

Ser Lys Asn Arg Ser Asp Pro Ile Val Leu Ile Val Asn Tyr Asn Asn
370 375 380

Arg Ala Gln Glu Asn Ile Leu Pro Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
385 390 395 400

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His
405 410 415

His His

<210> 58
<211> 675
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(651)
<223> miê`n ngoại bào của CEACAM5 ơ' ngươ`i

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (652)..(675)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 58

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
180 185 190

Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
275 280 285

Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu
290 295 300

Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr
305 310 315 320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
325 330 335

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
340 345 350

Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp
355 360 365

His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
370 375 380

Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
405 410 415

Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn
420 425 430

Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser
435 440 445

Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala
450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
500 505 510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
515 520 525

Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
530 535 540

Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
580 585 590

Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595 600 605

Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
625 630 635 640

Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser

645 650 655

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His
660 665 670

His His His
675

<210> 59
<211> 678
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(654)
<223> miề̀n ngoại bào của CEACAM5 ở khỉ cynomolgus

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HỖ̃N HỢP
<222> (655)..(678)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 59

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
35 40 45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
50 55 60

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

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

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu
275 280 285

Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys
290 295 300

Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr

305 310 315 320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu
325 330 335

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn
340 345 350

Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg
355 360 365

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
370 375 380

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn
385 390 395 400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe
405 410 415

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
420 425 430

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
435 440 445

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val
450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr
485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg
500 505 510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
515 520 525

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser
530 535 540

Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp
545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn
565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
580 585 590

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595 600 605

Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val
625 630 635 640

Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala Ser Gly
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
660 665 670

His His His His His His
675

<210> 60
<211> 317
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(293)
<223> miê`n ngoại bào của CEACAM6 ơ' ngươ`i

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (294)..(317)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 60

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr
35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala
165 170 175

Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Gly Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Ile Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala
275 280 285

Pro Val Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
290 295 300

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His
305 310 315

<210> 61
<211> 317
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(293)
<223> miề̀n ngoại bào của CEACAM6 ở khỉ cynomolgus

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HỖ˜N HƠ.P
<222> (294)..(317)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 61

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu

1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Thr Leu Gly Phe Asn
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Lys Arg Leu Ile Val Ala Tyr
35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Thr Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Met Ile Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

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

Thr Glu Glu Ala Thr Gly Arg Phe Trp Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Asp Phe Thr Cys Glu Pro Asp Ile His Ser Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asp Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala
165 170 175

Gly Ala Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Leu Ser
180 185 190

Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Ser Asn Ser Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala Tyr Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Met Met Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala
275 280 285

Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
290 295 300

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His
305 310 315

<210> 62
<211> 322
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(298)
<223> miê`n ngoại bào của CEACAM8 ơ' ngươ`i

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (299)..(322)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 62

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

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Asp Pro Arg Gly Tyr Asn
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Thr Val Asp Ala Asn Arg Arg Ile Ile Gly Tyr

35 40 45

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

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Met Arg Asn Val Thr Arg
65 70 75 80

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

Ser Glu Glu Val Thr Gly Gln Phe Ser Val His Pro Glu Thr Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Val
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Phe Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205

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

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ser Gln Tyr Ser Trp Ser Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Tyr Thr Gln Lys Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Thr Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Thr Thr Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Arg Asn Arg Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp Ala Leu
275 280 285

Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly
290 295 300

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His
305 310 315 320

His His

<210> 63
<211> 322
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(298)
<223> miê`n ngoại bào của CEACAM8 ở khỉ cynomolgus

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (299)..(322)
<223> phần mở rộng với His-tag
<400> 63

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

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asp Pro Leu Gly Tyr Asn
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Thr Val Asp Ala Asn Arg Arg Ile Ile Gly Tyr
35 40 45

Val Ile Ala Thr Gln Val Asn Ile Ser Gly Pro Ala Asp Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Thr Leu Leu Met Gln Asn Val Thr Arg
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Thr Leu Asn Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Val Thr Gly Gln Phe Ser Val His Pro Glu Thr Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Arg Asp Ala
115 120 125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asp Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Val Asn Phe Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Asn Ile
195 200 205

Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Leu Pro Gly Val Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Leu Ala Gln Tyr Ser Trp Ser Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln His Thr Gln Asn Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Ala Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Ala Thr Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly His Asn Gly Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp Ala Ser
275 280 285

Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly
290 295 300

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His
305 310 315 320

His His

<210> 64
<211> 237
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(213)
<223> miê`n ngoại bào của CEACAM7 ơ' ngươ`i

<220>
<221> MIỀN
<222> (214)..(237)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 64

Thr Asn Ile Asp Val Val Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Leu Val Val His Asn Glu Ser Gln Asn Leu Tyr Gly Tyr Asn Trp
20 25 30

Tyr Lys Gly Glu Arg Val His Ala Asn Tyr Arg Ile Ile Gly Tyr Val
35 40 45

Lys Asn Ile Ser Gln Glu Asn Ala Pro Gly Pro Ala His Asn Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Gly Thr Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr His
65 70 75 80

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

Asn Glu Glu Val Thr Arg Gln Phe Tyr Val Phe Ser Glu Pro Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Thr Ser Asn Asn Phe Asn Pro Val Glu Asn Lys Asp Ile
115 120 125

Val Val Leu Thr Cys Gln Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Leu Val Ser Pro Arg Leu Leu Leu Ser
145 150 155 160

Thr Asp Asn Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Ala Thr Lys Asn Asp Ile
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Gly Ala Ser Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Arg Tyr Glu Ser Val Gln Ala Ser Ser
195 200 205

Pro Asp Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His
225 230 235

<210> 65
<211> 292
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(286)
<223> hCEACAM5 N-A1-B1

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN HỢP
<222> (287)..(292)
<223> His-tag

<400> 65

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
180 185 190

Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala His His
275 280 285

His His His His
290

<210> 66
<211> 184
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(178)
<223> hCEACAM5 A2-B2

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (179)..(184)
<223> His-tag

<400> 66

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

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

20 25 30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
35 40 45

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
50 55 60

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser
65 70 75 80

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
85 90 95

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
100 105 110

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
115 120 125

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
130 135 140

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
145 150 155 160

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
165 170 175

Ser Ala His His His His His His
180

<210> 67
<211> 193
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(187)
<223> hCEACAM5 A3-B3

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN HỢP
<222> (188)..(193)
<223> His-tag

<400> 67

Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
1 5 10 15

Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
20 25 30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
35 40 45

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
50 55 60

Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
65 70 75 80

Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
85 90 95

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
115 120 125

Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
130 135 140

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

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
165 170 175

Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala His His His His His

180 185 190

His

<210> 68
<211> 310
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(286)
<223> miền N-A1-B1 của CEACAM5 ở khỉ cynomolgus

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN HỢP
<222> (287)..(310)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 68

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
35 40 45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
50 55 60

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

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

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Ser Gly
275 280 285

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
290 295 300

His His His His His His
305 310

<210> 69

<211> 202
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(178)
<223> miền A2-B2 của CEACAM5 ở khỉ cynomolgus

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN HỢP
<222> (179)..(202)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 69

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
1 5 10 15

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr
20 25 30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Glu Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro
50 55 60

Arg Asn Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser
65 70 75 80

Val Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
85 90 95

Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe
115 120 125

Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile
130 135 140

Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His
145 150 155 160

Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val
165 170 175

Tyr Val Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
180 185 190

Lys Ile Glu Trp His His His His His His
195 200

<210> 70
<211> 214
<212> PRT
<213> Khỉ Macaca fascicularis

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(190)
<223> miền A3-B3 của CEACAM5 ở khỉ cynomolgus
<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN HỢP
<222> (191)..(214)
<223> phần mở rộng với His-tag

<400> 70

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
1 5 10 15

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr
20 25 30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg
35 40 45

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
50 55 60

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser
65 70 75 80

Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp
85 90 95

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
115 120 125

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
130 135 140

Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser
145 150 155 160

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val
165 170 175

Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala Ser Gly
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
195 200 205

His His His His His His
210

<210> 71
<211> 344
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 71

Met Gly Pro Pro Ser Ala Pro Pro Cys Arg Leu His Val Pro Trp Lys
1 5 10 15

Glu Val Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn
195 200 205

Asp Ala Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn
210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Gly Pro
225 230 235 240

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

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
260 265 270

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
290 295 300

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met Ile Thr Val Ser Gly
305 310 315 320

Ser Ala Pro Val Leu Ser Ala Val Ala Thr Val Gly Ile Thr Ile Gly
325 330 335

Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile
340

<210> 72
<211> 265
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 72

Met Gly Ser Pro Ser Ala Cys Pro Tyr Arg Val Cys Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Leu Pro Asn
20 25 30

Ser Ala Gln Thr Asn Ile Asp Val Val Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Val Val His Asn Glu Ser Gln Asn Leu Tyr Gly
50 55 60

Tyr Asn Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val His Ala Asn Tyr Arg Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Lys Asn Ile Ser Gln Glu Asn Ala Pro Gly Pro Ala His

85 90 95

Asn Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Gly Thr Leu Leu Ile Gln Asn
100 105 110

Val Thr His Asn Asp Ala Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Glu
115 120 125

Asn Leu Val Asn Glu Glu Val Thr Arg Gln Phe Tyr Val Phe Ser Glu
130 135 140

Pro Pro Lys Pro Ser Ile Thr Ser Asn Asn Phe Asn Pro Val Glu Asn
145 150 155 160

Lys Asp Ile Val Val Leu Thr Cys Gln Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr
165 170 175

Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Leu Val Ser Pro Arg Leu
180 185 190

Leu Leu Ser Thr Asp Asn Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Ala Thr Lys
195 200 205

Asn Asp Ile Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Gly Ala
210 215 220

Ser Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Arg Tyr Glu Ser Val Gln
225 230 235 240

Ala Ser Ser Pro Asp Leu Ser Ala Gly Thr Ala Val Ser Ile Met Ile
245 250 255

Gly Val Leu Ala Gly Met Ala Leu Ile
260 265

<210> 73
<211> 349
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 73

Met Gly Pro Ile Ser Ala Pro Ser Cys Arg Trp Arg Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Phe Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Ile Glu Ala Val Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Asp Pro Arg Gly
50 55 60

Tyr Asn Trp Tyr Lys Gly Glu Thr Val Asp Ala Asn Arg Arg Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Asn Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Met Arg Asn Val
100 105 110

Thr Arg Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Leu Asn
115 120 125

Leu Met Ser Glu Glu Val Thr Gly Gln Phe Ser Val His Pro Glu Thr
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
195 200 205

Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn
210 215 220

Phe Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr His Ala Gly Val Asn Leu Asn
245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ser Gln Tyr Ser Trp Ser
260 265 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Tyr Thr Gln Lys Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Thr Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Thr Thr Asn Ser
290 295 300

Ala Thr Gly Arg Asn Arg Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp
305 310 315 320

Ala Leu Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Arg Ala Thr Val
325 330 335

Ser Ile Met Ile Gly Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile
340 345

<210> 74
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MAb2_VHg2

<400> 74

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 Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MAb2_VLg5

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> ca´c gô´c tại các vị trí từ 109 đến 115 của CEACAM5-A3B3 ở người

<400> 76

Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> ca´c gô´c tại các vị trí từ 131 đến 143 của CEACAM5-A3B3 ở người

<400> 77

Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe
1 5 10

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐĂ.C TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (3)..(3)
<223> Xaa la` T, A hoă.c V

<400> 78

Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là S hoặc N (đặc biệt là S)

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Y hoặc G (đặc biệt là G)

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là R hoặc I (đặc biệt là I)

<400> 79

Ile Xaa Ser Xaa Gly Gly Xaa Thr
1 5

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là A hoặc T (đặc biệt là A)

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là T hoặc S (đặc biệt là S)

<400> 80

Xaa Ala His Tyr Phe Gly Xaa Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là R hoặc S, đặc biệt là S

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (8)..(8)
<223> Xaa la` A hoă.c D

<400> 81

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (6)..(6)
<223> Xaa la` không co´, S hoặc G (đặc biệt là G)

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (7)..(7)
<223> Xaa la` D, Y hoă.c I

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (8)..(8)
<223> Xaa là T hoặc I (đặc biệt là T)

<400> 82

Ile Ser Ser Gly Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (1)..(6)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<400> 83

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Asp
1 5

<210> 84
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là A hoặc S

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Y, F hoặc W

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (7)..(8)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ
<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P

<222> (13)..(13)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ
<400> 84

Xaa Xaa His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Gly Pro Xaa Ala Xaa
1 5 10

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (1)..(3)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Y, F hoặc W

<220>
<221> ĐẶC TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<400> 85

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CDR

<220>
<221> ĐĂ.C TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (1)..(2)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> ĐĂ.C TI´NH HÔ˜N HƠ.P
<222> (4)..(4)

<223> Xaa là Y, F hoặc W

<220>
<221> ĐĂC TI´NH HÔ˜N HƠP
<222> (5)..(6)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> ĐĂC TI´NH HÔ˜N HƠP
<222> (8)..(9)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<400> 86

Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa
1 5

<210> 87
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> trình tự chuô˜i nặng của huMAb2-3

<400> 87

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu 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

<210> 88
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> trình tự chuô˜i nhẹ của huMAb2-3

<400> 88

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 89
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng VH1-IgG1 cu˚a MAb2

<400> 89

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Ser Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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

<210> 90
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ VL1d cu˙a MAb2

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210