



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

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



1-0051294

(51)^{2022.01} **A61K 47/68; C07K 16/30; C07K 16/18;** (13) **B**
A61K 39/395; A61P 35/00

(21) 1-2023-03160

(22) 19/10/2021

(86) PCT/CN2021/124698 19/10/2021

(87) WO 2022/078523 21/04/2022

(30) 202011105383.0 15/10/2020 CN

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/08/2023 425A

(73) 1. SHANGHAI MIRACOGEN INC. (CN)

Suite 4E, Building 3, No. 1238 Zhangjiang Rd, Pudong District, Shanghai 201203, China

2. KEYMED BIOSCIENCES CO., LTD (CN)

Building 2, No. 18, Bio-town Middle Road, Chengdu Tianfu International Bio-town, Shuangliu District Chengdu, Sichuan 610219, China

(72) HU, Chaohong (US); LI, Hu (US); CHEN, Bo (US); XU, Gang (CN); WANG, Ying (CN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) THẺ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ DƯỢC CHẤT VÀ CHẾ PHẨM CHỨA THẺ LIÊN HỢP NÀY

(21) 1-2023-03160

(57) Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể-dược chất và ứng dụng của thể liên hợp này, và cụ thể là sáng chế đề xuất thể liên hợp kháng thể-dược chất, muối và solvat được dụng của thể liên hợp này, hoặc solvat của muối nêu trên. Thể liên hợp kháng thể-dược chất có cấu trúc được biểu diễn bằng công thức I, trong đó Ab là kháng thể kháng Claudin 18.2. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của tế bào khối u in vivo và in vitro tốt, độc tính thấp, và triển vọng ứng dụng tốt.

Ab- (L-D)_p

Công thức 1

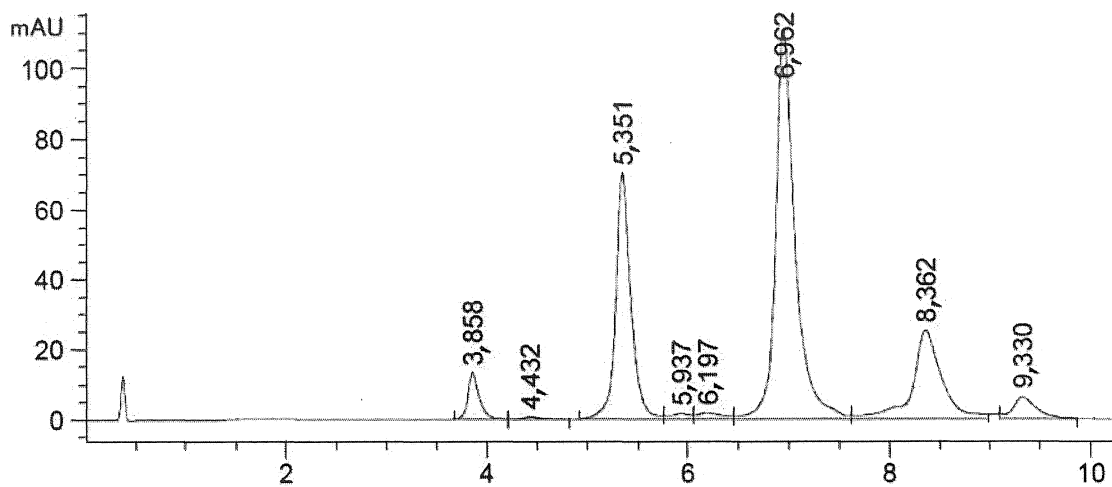


Fig. 6

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực hóa dược, cụ thể, liên quan đến thể liên hợp kháng thể dược chất và ứng dụng của thể liên hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư dạ dày là một trong số các bệnh ung thư phổ biến nhất trên toàn thế giới, với tỷ lệ mắc bệnh cao hơn ở Đông Á, Đông Âu, và Nam Mỹ, và tỷ lệ mắc bệnh thấp hơn ở Bắc Mỹ và Africa. Phương pháp điều trị ban đầu tiêu chuẩn cho bệnh ung thư dạ dày tiến triển hoặc tái phát là hóa trị. Mặc dù tiên lượng của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư dạ dày đã được cải thiện đáng kể nhờ sự phát triển của các kỹ thuật phẫu thuật và điều trị trước, trong và sau quá trình phẫu thuật, nhưng tỷ lệ sống sót toàn diện sau 5 năm chỉ chiếm 10-15%. Liệu pháp nhắm đích đã mang lại hi vọng mới để điều trị bệnh ung thư dạ dày tái phát/tiến triển. Trastuzumab được kết hợp với hóa trị có thể mang lại một số lợi ích cho bệnh nhân dương tính với HER2, nhưng chỉ 15% bệnh nhân có biểu hiện dương tính với HER2, và đối tượng hưởng lợi còn hạn chế. Trong những năm gần đây, liệu pháp miễn dịch đã mang lại hi vọng mới để điều trị bệnh ung thư dạ dày tái phát/tiến triển; tuy nhiên, theo các kết quả của nghiên cứu KEYNOTE-12, tỷ lệ đối tượng dương tính với PD-L1 phù hợp cho việc điều trị này chỉ chiếm 40% số bệnh nhân mắc bệnh ung thư dạ dày tái phát/tiến triển hoặc bệnh ung thư biểu mô tuyến đoạn nối thực quản-dạ dày. Do đó, việc phát triển các dược chất mới điều trị ung thư dạ dày vẫn là nhu cầu cấp thiết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tác giả sáng chế đã điều chế thể liên hợp kháng thể dược chất kháng Claudin 18.2 qua nhiều thử nghiệm và công trình sáng tạo, và đã xác nhận được rằng thể liên hợp này có hoạt tính sinh học tốt, từ đó hoàn thành sáng chế.

Để đạt được mục đích này, theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề xuất thể liên hợp kháng thể dược chất, muối, solvat dược dụng hoặc solvat của muối nêu trên, và thể liên hợp kháng thể dược chất này có cấu trúc được thể hiện trong công thức I,

Ab- (L-D) _p

Công thức I

trong đó:

Ab là kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 68, 76, 84, 92, 100, 108 hoặc 116 hoặc thể đột biến của chúng, CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 69, 77, 85, 93, 101, 109 hoặc 117 hoặc thể đột biến của chúng, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 70, 78, 86, 94, 102, 110 hoặc 118 hoặc thể đột biến của chúng, CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 50, 58, 124 hoặc 132 hoặc thể đột biến của chúng, CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 51, 59, 125 hoặc 133 hoặc thể đột biến của chúng, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 52, 60, 126 hoặc 134 hoặc thể đột biến của chúng;

D là chất gây độc tế bào.

L là chất liên kết để liên kết kháng thể kháng Claudin 18.2 và chất gây độc tế bào;

p nằm trong khoảng từ 2,0 đến 8,0 (ví dụ, 2,0 đến 7,0, 2,0 đến 6,0, 2,0 đến 5,0, 2,0 đến 4,0, 3,0 đến 7,0, 3,0 đến 6,0, 3,0 đến 5,0 hoặc 3,0 đến 4,0, hoặc ví dụ, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 hoặc 7,0).

Thể liên hợp kháng thể được chất theo sáng chế có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của tế bào khối u tốt ở cả *in vivo* và *in vitro*, và có triển vọng ứng dụng tốt. Thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế được tạo thành bằng cách liên kết kháng thể kháng Claudin 18.2 và dẫn xuất dolastatin MMAE thông qua chất liên kết MC-vc-PAB, và cơ chế hoạt động kháng u của nó như sau. Sau khi liên kết với Claudin 18.2 trên bề mặt của các tế bào khối u, thể liên hợp kháng thể được chất đi vào các tế bào khối u qua quá trình nhập nội bào và vận chuyển tới lysosom, và sau đó được phân hủy bởi proteaza trong lysosom để giải phóng MMAE. Sau khi đi vào tế bào chất, MMAE liên kết với

tubulin và ức chế quá trình polyme hóa của nó, nhờ đó phong bế các chức năng sinh lý khác nhau của tế bào bao gồm cả gián phân tubulin, nhờ đó ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u và dẫn tới chết tế bào khối u.

Cần lưu ý rằng "thể liên hợp kháng thể được chất" là chế phẩm chứa các phân tử ADC có giá trị DAR giống hoặc khác nhau. Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa nhiều phân tử ADC. Theo các trường hợp nhất định, nhiều ADC, mỗi ADC bao gồm cùng một số lượng phân tử được chất trong chế phẩm. Theo các trường hợp khác, nhiều ADC, mỗi ADC bao gồm số lượng khác nhau của các phân tử được chất trong chế phẩm.

Tỷ lệ được chất so với kháng thể (DAR) nêu trên đề cập đến số lượng phân tử được chất (ví dụ, p trong công thức I) được liên hợp với kháng thể. Số lượng phân tử được chất được chứa trong thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế (ví dụ, p trong công thức I) thường là số nguyên. Khi số lượng phân tử được chất được chứa trong thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế (ví dụ, p trong công thức I) là phân số, nó đề cập đến số lượng trung bình của các phân tử được chất được liên hợp với mỗi kháng thể trong chế phẩm chứa nhiều phân tử ADC.

Tỷ lệ được chất so với kháng thể (DAR) nêu trên có thể được xác nhận bằng các phương pháp thông thường, như phép ghi phổ khối, thử nghiệm ELISA, HIC và HPLC. Phân bố định lượng của ADC theo giá trị p cũng có thể được xác định. Trong một số trường hợp, việc tách, tinh chế và xác nhận ADC đồng nhất đối với giá trị p cụ thể từ các ADC có tải lượng được chất khác có thể được thực hiện bằng các phương pháp như HPLC pha đảo hoặc điện di.

Theo một số phương án, CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34 hoặc 42 hoặc thể đột biến của chúng, CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35 hoặc 43 hoặc thể đột biến của chúng, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36 hoặc 44 hoặc thể đột biến của chúng, CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 50 hoặc 58 hoặc thể đột biến của chúng, CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 51 hoặc 59 hoặc thể đột biến của chúng, và CDR3

của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 52 hoặc 60 hoặc thể đột biến của chúng.

Theo một số phương án, CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 68, 76, 84, 92, 100, 108 hoặc 116 hoặc thể đột biến của chúng, CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 69, 77, 85, 93, 101, 109 hoặc 117 hoặc thể đột biến của chúng, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 70, 78, 86, 94, 102, 110 hoặc 118 hoặc thể đột biến của chúng, CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 124 hoặc 132 hoặc thể đột biến của chúng, CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 125 hoặc 133 hoặc thể đột biến của chúng, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 126 hoặc 134 hoặc thể đột biến của chúng.

Theo một số phương án, CDR1, CDR2, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
- (2) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,
- (3) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,
- (4) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,
- (5) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,
- (6) SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44,
- (7) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,
- (8) SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78,
- (9) SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86,
- (10) SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94,
- (11) SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,
- (12) SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,

(13) SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118;

CDR1, CDR2, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

(1) SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,

(2) SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60,

(3) SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126,

(4) SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134.

Theo một số phương án, CDR1, CDR2, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

(1) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,

(2) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,

(3) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,

(4) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

(5) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,

(6) SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44;

CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

(1) SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,

(2) SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60.

Theo một số phương án, CDR1, CDR2, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

(1) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,

(2) SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78,

(9) SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86,

(4) SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94,

(5) SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,

(6) SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,

(7) SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118;

CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

(1) SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126,

(2) SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134.

Theo một số phương án, FR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 71, 79, 87, 95, 103, 111 hoặc 119 hoặc thể đột biến của chúng, FR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 72, 80, 88, 96, 104, 112 hoặc 120 hoặc thể đột biến của chúng, FR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 73, 81, 89, 97, 105, 113 hoặc 121 hoặc thể đột biến của chúng, FR4 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 74, 82, 90, 98, 106, 114 hoặc 122 hoặc thể đột biến của chúng, FR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 53, 61, 127 hoặc 135 hoặc thể đột biến của chúng, FR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 54, 62, 128 hoặc 136 hoặc thể đột biến của chúng, FR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 55, 63, 129 hoặc 137 hoặc thể đột biến của chúng, và FR4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 56, 64, 130 hoặc 138 hoặc thể đột biến của chúng.

Theo một số phương án, FR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37 hoặc 45 hoặc thể đột biến của chúng, FR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38 hoặc 46 hoặc thể đột biến của chúng, FR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39 hoặc 47 hoặc thể đột biến của chúng, FR4 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40 hoặc 48 hoặc thể đột biến của chúng.

biến của chúng, FR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 53 hoặc 61, hoặc thể đột biến của chúng, FR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 54 hoặc 62 hoặc thể đột biến của chúng, FR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 55 hoặc 63 hoặc thể đột biến của chúng, và FR4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 56 hoặc 64 hoặc thể đột biến của chúng.

Theo một số phương án, FR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 71, 79, 87, 95, 103, 111 hoặc 119 hoặc thể đột biến của chúng, FR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 72, 80, 88, 96, 104, 112 hoặc 120 hoặc thể đột biến của chúng, FR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 73, 81, 89, 97, 105, 113 hoặc 121 hoặc thể đột biến của chúng, FR4 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 74, 82, 90, 98, 106, 114 hoặc 122 hoặc thể đột biến của chúng, FR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 127 hoặc 135 hoặc thể đột biến của chúng, FR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 128 hoặc 136 hoặc thể đột biến của chúng, FR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 129 hoặc 137 hoặc thể đột biến của chúng, và FR4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 130 hoặc 138 hoặc thể đột biến của chúng.

Theo một số phương án, FR1, FR2, FR3, FR4 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,
- (2) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,
- (3) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
- (4) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,
- (5) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,

- (6) SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48,
- (7) SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74,
- (8) SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82,
- (9) SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90,
- (10) SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,
- (11) SEQ ID NO 103, SEQ ID NO 104, SEQ ID NO 105, SEQ ID NO 106,
- (12) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,
- (13) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122;

FR1, FR2, FR3 và FR4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56,
- (2) SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64,
- (3) SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130,
- (4) SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138.

Theo một số phương án, FR1, FR2, FR3, FR4 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,
- (2) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,
- (3) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
- (4) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,
- (5) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,
- (6) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48;

FR1, FR2, FR3 và FR4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56,
- (2) SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64.

Theo một số phương án, FR1, FR2, FR3, FR4 của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74,
- (2) SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82,
- (3) SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90,
- (4) SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,
- (5) SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106,
- (6) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,
- (7) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122;

FR1, FR2, FR3 và FR4 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130,
- (2) SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138.

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 67, 75, 83, 91, 99, 107, hoặc 115;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 49, 57, 123 hoặc 131.

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33 hoặc 41;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 49 hoặc 57.

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 67, 75, 83, 91, 99, 107 hoặc 115;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 123 hoặc 131.

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các tổ hợp trình tự sau đây:

- (1) SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 57,
- (2) SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 49,
- (3) SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 57,
- (4) SEQ ID NO: 115 và SEQ ID NO: 131.

Theo một số phương án, các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 lần lượt là SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 49.

Theo một số phương án, vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ các vùng hằng định IgG (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE của người, hoặc các thể đột biến của các vùng hằng định nêu trên, tốt hơn là IgG1 của người;

vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 được chọn từ vùng hằng định lamda, vùng hằng định kapa của người hoặc thể đột biến của các vùng hằng định nêu trên, tốt hơn là vùng hằng định kapa của người.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65, hoặc trình tự có độ đồng nhất lớn hơn 70%, như lớn hơn 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% với SEQ ID NO: 65;

trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Claudin 18.2 chứa trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 66, hoặc trình tự có độ đồng nhất lớn hơn 70%, như lớn hơn 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% với SEQ ID NO: 66.

Theo một số phương án, p nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,0.

Theo một số phương án, p nằm trong khoảng từ 3,0 đến 3,8.

Theo một số phương án, p là 3,0, 3,4, 3,5, hoặc 3,8.

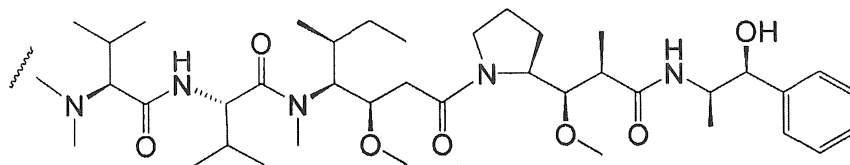
Theo một số phương án, p là 3,8.

Theo một số phương án, chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm SN-38, Gemcitabin, Monomethyl auristatin E (MMAE), Monomethyl auristatin F (MMAF), maytansinoid (ví dụ, Maytansin DM1, Maytansin DM4), calicheamicin, MGBA (ví dụ,

duocarmycin), doxorubicin, ricin, độc tố Diphtheria và các độc tố khác, I131, interleukin, yếu tố gây hoại tử khối u, chemokin và các hạt nano.

Theo một số phương án, chất gây độc tế bào là MMAE.

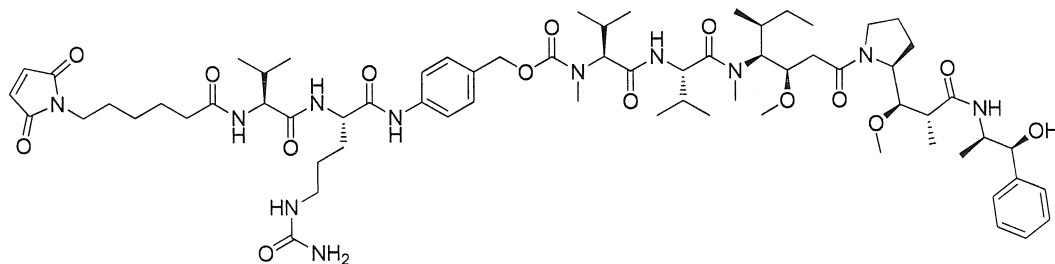
Cấu trúc của MMAE là:



Theo một số phương án, chất liên kết được chọn từ nhóm bao gồm 6-maleimidohexanoyl (MC), maleimidopropionyl (MP), N-suxinimidyl 4-(2-pyridylthio) valerat (SPP), 4-(N-maleimidometyl)-xyclohexan-1-formyl (MCC), N-suxinimidyl(4-iodo-axetyl)aminobenzoat (SIAB), và 6-maleimidocaproyl-valin-xitrulin-p-aminobenzyloxycarbonyl (MC-vc-PAB).

Theo một số phương án, chất liên kết là 6-maleimidocaproyl-valin-xitrulin-p-aminobenzyloxycarbonyl (MC-vc-PAB).

Theo một số phương án, L-D như được mô tả trong công thức I là MC-vc-PAB-MMAE, và cấu trúc của nó được thể hiện trong công thức sau đây:



Theo một số phương án,

Ab bao gồm:

(a) CDR1, CDR2, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng và CDR1, CDR2, CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự của CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 42, trình tự của CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 43, trình tự của CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 44, trình tự của CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 50, trình tự của CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ

được thể hiện trong SEQ ID NO: 51, và trình tự của CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 52;

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 41, và trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 49; và/hoặc

(c) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 65, và trình tự chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 66;

L là MC-vc-PAB; và

D là MMAE.

Theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa thể liên hợp kháng thể được chất nêu trên, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối này.

Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa các dược chất hóa trị liệu đã biết để điều trị khối u, như doxorubicin (Adriamycin), xyclophosphamit, taxan [như paclitaxel (Taxol)], docetaxel (Taxotere)], capecitabin (Xeloda), gemcitabin (Gemzar), vinorelbin (Navelbine), tamoxifen, chất ức chế aromataza (Arimidex, Furlong, Arnold New), 5-FU cộng leucovorin, irinotecan (camptosar), oxaliplatin, cisplatin, carboplatin, estramustin, mitoxantron (Novantrone), prednison, vincristin (Oncovin), doxorubicin, prednison, v.v., hoặc kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa dược chất miễn dịch trị liệu đã biết để điều trị khối u, ví dụ, kháng thể đơn dòng PD-1 (như pembrolizumab, nivolumab, v.v.), kháng thể đơn dòng PD-L1 (như Atezolizumab), kháng thể đơn dòng TIGIT, kháng thể đơn dòng 4-1BB, kháng thể đơn dòng VEGFR2 (như Ramucirumab, apatinib), kháng thể đơn dòng HER2 (như trastuzumab, chất tương tự sinh học Trastuzumab, Trastuzumab-dkst), v.v., hoặc kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa chất ức chế miễn dịch được chọn từ: (1) glucocorticoit, như cortison và prednison; (2) chất chuyển hóa của vi sinh vật, như xyclosporin và tacrolimus, v.v.; (3) chất chống chuyển hóa, như azathioprin và 6-mercaptopurin, v.v.; (4) kháng thể kháng lympho bào đa dòng và đơn dòng, như globulin kháng lympho bào và OKT3, v.v.; (5) chất alkyl hóa, như xyclophosphamit. Cụ thể, chất ức chế miễn dịch là, ví dụ, metylprednisolon, prednison, azathioprin, prograf, xenipra,

sule, xyclosporin, tacrolimus, rapamycin, mycophenolat mofetil, mizoribin, xyclophosphamit, fingolimod, v.v.

Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

Theo khía cạnh thứ ba của sáng chế, sáng chế đề xuất việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trên, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này hoặc chế phẩm nêu trên trong việc bào chế thuốc, các thuốc này được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến Claudin 18.2.

Theo một số phương án, bệnh liên quan đến Claudin 18.2 là bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư biểu mô tuyến của đoạn nối thực quản-dạ dày, bệnh ung thư tụy.

Theo một số phương án, bệnh liên quan đến Claudin 18.2 là bệnh ung thư dạ dày.

Theo khía cạnh thứ tư của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến Claudin 18.2, bao gồm các bước: cho đối tượng cần ngăn ngừa và/hoặc điều trị sử dụng lượng hữu hiệu phòng bệnh và/hoặc điều trị của hợp chất chứa thể liên hợp kháng thể dược chất nêu trên, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, hoặc chế phẩm nêu trên.

Theo một số phương án, bệnh liên quan đến Claudin 18.2 là bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư biểu mô tuyến của đoạn nối thực quản-dạ dày, bệnh ung thư tụy.

Theo một số phương án, bệnh liên quan đến Claudin 18.2 là bệnh ung thư dạ dày.

Theo khía cạnh thứ năm của sáng chế, sáng chế đề xuất thể liên hợp kháng thể dược chất nêu trên, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, hoặc chế phẩm nêu trên, được dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến Claudin 18.2.

Theo một số phương án, bệnh liên quan đến Claudin 18.2 là bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư biểu mô tuyến của đoạn nối thực quản-dạ dày, bệnh ung thư tụy.

Theo một số phương án, bệnh liên quan đến Claudin 18.2 là bệnh ung thư dạ dày.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện RT-PCR của ví dụ theo sáng chế cho thấy rằng các dòng tế bào

chuyển nhiễm ổn định HEK293 lần lượt biểu hiện Claudin 18.1 và Claudin 18.2; cả dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 và tế bào KATO III đối chứng đều có thể khuếch đại đặc trưng 780bp đặc hiệu với Claudin 18.2, trong khi HEK293 biểu hiện Claudin 18.1 chỉ có thể khuếch đại một đoạn chung là 504bp.

Fig. 2 là kết quả sàng lọc dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao bằng FACS trong ví dụ theo sáng chế, trong đó các chấm đen là đối chứng âm, và các chấm xám là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao.

Fig. 3 là kết quả sàng lọc dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định NIH3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao bằng FACS trong ví dụ theo sáng chế, trong đó vạch đen là đối chứng âm, và phần tô xám là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2; NO.32-H là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao, NO.18-M là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ trung bình, và NO.6-L là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ thấp.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện các kết quả của tác dụng ADCC của kháng thể kháng Claudin18.2 theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện các kết quả của tác dụng CDC của kháng thể kháng Claudin18.2 theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 6 là sắc ký đồ tương tác kỵ nước (HIC) của thể liên hợp kháng thể-dược chất theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 7 là đồ thị thể hiện các kết quả của tác dụng tiêu diệt tế bào trên dòng tế bào LT-M11 của các ADC CM311 khác nhau theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 8 là đồ thị thể hiện các kết quả của hoạt tính ức chế trên sự sinh trưởng của khối u ở mô hình PDX chuột không lông mắc bệnh ung thư dạ dày của người STO#025 của CM311-ADC-1 và CM311-ADC-2 đối chứng theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 9 là đồ thị cho thấy các tác dụng trên thể trọng của động vật trong mô hình PDX của chuột không lông mắc bệnh ung thư dạ dày của người STO#025 của CM311-ADC-1 và CM311-ADC-2 đối chứng theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 10 là đồ thị thể hiện các kết quả của hoạt tính ức chế trên sự sinh trưởng khối

u của mô hình PDX chuột không lông mắc bệnh ung thư dạ dày của người STO#523 của CM311-ADC-1 và CM311-ADC-2 đối chứng theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 11 là đồ thị cho thấy tác dụng trên thể trọng của động vật trong mô hình PDX của chuột không lông mắc bệnh ung thư dạ dày của người STO#025 của CM311-ADC-1 và CM311-ADC-2 đối chứng theo ví dụ của sáng chế.

Fig. 12 là đồ thị thể hiện các kết quả so sánh giữa hoạt tính tế bào in vitro của thể liên hợp kháng thể-độc chất theo ví dụ của sáng chế và kháng thể (đồ thị khớp độc lập biến đổi Log QC).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết khi tham chiếu đến các ví dụ sau đây, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các ví dụ sau đây nhằm để minh họa sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Trong trường hợp các điều kiện cụ thể không được chỉ ra trong các ví dụ, chúng được thực hiện theo các điều kiện thông thường hoặc các điều kiện do nhà sản xuất đề xuất. Các thuốc thử hoặc dụng cụ được sử dụng, nếu nhà sản xuất không được chỉ định, là những sản phẩm thông thường có thể mua được trên thị trường.

Theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Hơn nữa, các quy trình trong phòng thí nghiệm và các thuật ngữ liên quan đến hóa học protein và axit nucleic, sinh học phân tử, nuôi cấy tế bào và mô, vi sinh học, miễn dịch học được sử dụng ở đây là các thuật ngữ và quy trình thông thường được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực tương ứng. Đồng thời, để hiểu sáng chế rõ hơn, các định nghĩa và giải thích thuật ngữ có liên quan được đưa ra dưới đây.

Claudin protein là protein xương mà cấu tạo nên cấu trúc mỗi nối chặt chẽ. Nó nằm ở phía trên cùng của các khoảng gian bào liên kề. Phân bố của nó là đặc hiệu mô-cơ quan. Chức năng chính của nó là kết dính gian bào, duy trì tính phân cực tế bào, điều hòa tính thấm giữa các tế bào (paracellular), và tham gia vào việc điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa tế bào. Ở các khối u, các mối nối chặt chẽ giữa các tế bào bị phá hủy và Claudin không thể thực hiện được chức năng thông thường của nó.

Claudin 18 là thành viên của họ Claudin có 2 exon thứ nhất khác nhau, nên hai

isoform có thể được tạo ra bằng cách ghép nối luân phiên: Claudin 18.1 và Claudin 18.2. Hai isoform này được phiên mã và khuếch đại ở các mô khác nhau tương ứng, trong số đó, Claudin 18.1 chủ yếu được biểu hiện ở mô phổi, trong khi Claudin 18.2 được biểu hiện đặc hiệu ở mô dạ dày. Claudin 18.2 (số đăng ký ngân hàng gen: NM_001002026.3) không được biểu hiện ở các mô bình thường khác trừ niêm mạc dạ dày, nhưng nó được điều hòa tăng đáng kể ở nhiều khối u khác nhau, bao gồm 80% ở u tuyến dạ dày-ruột, 60% ở u tụy, và một số khối u đường mật, buồng trứng, và phổi.

Thuật ngữ "bệnh liên quan đến Claudin 18.2" đề cập đến bệnh trong đó biểu hiện của Claudin 18.2 trong các tế bào mô khác với (ví dụ, vượt quá) mức bình thường. Ví dụ, nếu mức biểu hiện của Claudin 18.2 trong tế bào mô nhất định cao hơn mức biểu hiện của Claudin 18.2 trong tế bào mô tham chiếu hoặc đối chứng (tức là, tế bào mô bình thường), nó chỉ ra rằng sự tồn tại của bệnh liên quan đến Claudin 18.2 ở đối tượng (đặc biệt là người) mà tế bào mô có nguồn gốc từ đó.

Theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, phạm vi số bất kỳ nên được hiểu là giá trị bất kỳ hoặc phạm vi phụ bất kỳ nằm trong phạm vi này.

Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể" đề cập đến phân tử globulin miễn dịch thường bao gồm hai cặp giống hệt nhau của các chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (L) và một chuỗi "nặng" (H). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được chia thành hai loại: kapa và lamda. Chuỗi nặng có thể được chia thành năm loại: μ , δ , γ , α hoặc ϵ , và kháng thể có thể được chia thành năm loại: IgM, IgD, IgG, IgA và IgE theo sự khác nhau của chuỗi nặng. Trong các chuỗi nhẹ và nặng, các vùng biến đổi và hằng định được liên kết bằng vùng "J" chứa khoảng 12 hoặc nhiều hơn 12 axit amin, và chuỗi nặng còn chứa vùng "D" chứa khoảng 3 hoặc nhiều hơn 3 axit amin. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng hằng định chuỗi nặng (C_H). Vùng hằng định chuỗi nặng gồm 3 miền (C_{H1} , C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (C_L). Vùng hằng định chuỗi nhẹ gồm một miền, C_L . Vùng hằng định của kháng thể có thể điều tiết khả năng liên kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc yếu tố của vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) và thành phần C1q của hệ thống bổ thể. Các vùng V_H và V_L cũng có thể được chia nhỏ thành các vùng có tính biến đổi cao gọi là vùng quyết định bổ sung (CDR) xen kẽ với các vùng được bảo toàn hơn gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm 3 CDR và 4 FR được sắp xếp theo thứ tự: FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3, FR4 từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy. Các vùng biến đổi (V_H và V_L) của mỗi cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ, tương ứng, tạo thành vị trí liên kết kháng thể. Việc phân bổ các axit amin vào các vùng hoặc miền cấu trúc tương ứng tuân theo định nghĩa trong tài liệu Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), hoặc Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883.

Theo sáng chế, các thuật toán để xác định độ đồng nhất trình tự (tương đồng) và tỷ lệ phần trăm độ giống nhau về trình tự là, ví dụ, thuật toán BLAST và BLAST 2.0, lần lượt được mô tả trong Altschul et al. (1977) Nucl. Acid. Res. 25:3389- 3402 và Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. BLAST và BLAST 2.0 có thể được sử dụng để xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin theo sáng chế bằng cách sử dụng, ví dụ, BLAST và BLAST 2.0 được mô tả trong tài liệu hoặc các tham số mặc định. Phần mềm để thực hiện phân tích BLAST khả dụng để công bố thông qua Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia.

Theo sáng chế, trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70% với trình tự axit amin chứa trình tự polypeptit mà về cơ bản đồng nhất với trình tự axit amin này, ví dụ, trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, tốt hơn là ít nhất là 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn so với trình tự polypeptit của sáng chế, khi sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây (ví dụ, phân tích BLAST sử dụng các tham số chuẩn).

Theo sáng chế, thể đột biến của trình tự axit amin đề cập đến thể đột biến có độ đồng nhất lớn hơn 70%, như lớn hơn 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với trình tự axit amin, ví dụ, các trình tự có 3, 2 hoặc 1 đột biến thay thế, xóa đoạn hoặc bổ sung của axit amin. Tốt hơn là, không nhiều hơn 3 axit amin được thay thế, bổ sung hoặc xóa đoạn. Tốt hơn nữa là, không nhiều hơn 2 axit amin được thay thế, bổ sung hoặc xóa đoạn. Tốt hơn cả là, không nhiều hơn 1 axit amin được thay thế, bổ sung hoặc xóa đoạn.

Biến thể "thay thế" là biến thể trong đó ít nhất là một gốc axit amin trong trình tự tự nhiên được loại bỏ và axit amin khác được cài xen vào cùng vị trí của nó. Các đột biến thay thế này có thể là một, trong đó chỉ một axit amin được thay thế trong phân tử, hoặc có thể là nhiều, trong đó cùng một phân tử có hai hoặc nhiều axit amin được thay

thể. Nhiều đột biến thay thế có thể được thực hiện ở các vị trí liên tiếp. Tương tự, một axit amin có thể được thay thế bằng nhiều gốc, trong đó các biến thể này bao gồm cả đột biến thay thế và đột biến cài xen. Biến thể "cài xen" (hoặc "bổ sung") là biến thể trong đó một hoặc nhiều axit amin được cài xen vào vị trí cụ thể sát ngay cạnh với trình tự tự nhiên. Sát ngay cạnh với axit amin nghĩa là gắn vào nhóm chức alpha-carboxyl hoặc alpha-amino của axit amin. Biến thể "xóa đoạn" là biến thể trong đó một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin tự nhiên đã được loại bỏ. Thông thường, các biến thể xóa đoạn có một hoặc hai axit amin được xóa đoạn trong vùng cụ thể của phân tử của chúng.

Theo các phương án nhất định, ít hơn lượng tối đa theo lý thuyết của gốc được chất được liên hợp với kháng thể trong phản ứng liên hợp. Nói chung, kháng thể không chứa nhiều nhóm xystein thiol tự do và phản ứng mà có thể liên kết gốc được chất; trên thực tế, đa số nhóm xystein thiol trong kháng thể tồn tại dưới dạng cầu nối disulfua. Theo các phương án nhất định, kháng thể có thể được khử với chất khử như dithiothreitol (DTT) hoặc tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) ở các điều kiện khử một phần hoặc toàn bộ để tạo ra nhóm xystein thiol phản ứng.

Theo một số phương án, muối được dụng là muối axit vô cơ hoặc muối axit hữu cơ, trong đó muối axit vô cơ là hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua, nitrat, bicacbonat, cacbonat, sulfat hoặc phosphat, muối axit hữu cơ là format, axetat, propionat, benzoat, maleat, fumarat, suxinat, tartrat, xitrat, ascorbat, α -ketoglutarat, α -glyxerophosphat, alkyl sulfonat hoặc aryl sulfonat; tốt hơn là, alkyl sulfonat là metansulfonat hoặc etansulfonat; aryl sulfonat là benzensulfonat hoặc p-toluensulfonat.

Muối được dụng có thể thu được bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách cho lượng đủ của hợp chất bazơ phản ứng với axit thích hợp tạo ra anion được dụng.

Như được sử dụng ở đây, trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "tiền được chất" đề cập đến dẫn xuất có thể được thủy phân, oxy hóa, hoặc được phản ứng cách khác dưới các điều kiện sinh học (in vitro hoặc in vivo) để tạo ra hợp chất theo sáng chế. Tiền được chất chỉ trải qua phản ứng này dưới các điều kiện sinh học để trở thành hoạt chất, hoặc chúng bất hoạt ở dạng không được phản ứng của chúng. Tiền được chất thường có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, như phương pháp được mô

tả trong Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff, ed., 5th ed.).

Theo sáng chế, solvat đề cập đến các dạng của thể liên hợp kháng thể-dược chất này theo sáng chế: phức hợp ở dạng rắn hoặc lỏng được tạo thành bằng cách phối trí các thể liên hợp kháng thể-dược chất với phân tử dung môi. Hydrat là dạng solvat cụ thể, được phối trí phân tử nước. Theo sáng chế, hydrat là solvat được ưu tiên.

Phương pháp bào chế các dược phẩm khác nhau chứa lượng hoạt chất là đã biết, hoặc sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này theo sáng chế. Như được mô tả trong REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995), phương pháp bào chế các dược phẩm này bao gồm bước kết hợp các tá dược, chất mang, chất pha loãng, v.v. dược thích hợp, mà không gây độc cho tế bào hoặc động vật có vú khi chúng tiếp xúc với các chất này ở liều lượng và nồng độ được sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các dung dịch nước đệm pH; ngoài ra có thể bao gồm chất đệm, như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic; polypeptit có khối lượng phân tử thấp (nhỏ hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manozơ, hoặc dextrin; các chất tạo chelat như EDTA; các rượu đường như manitol hoặc sorbitol; các đối ion tạo muối như natri; và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion hóa như TWENTM, polyetylen glycol (PEG), và PLURONICS™.

Dược phẩm theo sáng chế được sản xuất bằng các phương pháp đã biết, bao gồm phương pháp trộn, hòa tan hoặc làm khô lạnh thông thường. Hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế thành dược phẩm và được sử dụng cho bệnh nhân theo nhiều đường khác nhau thích hợp cho phương thức sử dụng được chọn, ví dụ, theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa (theo đường trong tĩnh mạch, trong cơ, tại chỗ hoặc dưới da).

Do đó, các hợp chất theo sáng chế kết hợp với chất mang dược dụng (ví dụ, chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể tiêu hóa và có thể ăn được) có thể được sử dụng toàn thân, ví dụ, theo đường miệng. Chúng có thể được bọc trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, có thể được nén thành viên nén. Đối với sử dụng trị liệu đường miệng,

hoạt chất có thể được kết hợp với một hoặc nhiều tá dược và có ở dạng viên nén có thể nuốt được, viên nén ngậm trong miệng, viên ngậm hình thoi, viên nang, còn ngọt, hỗn dịch, siro, viên nhện, và dạng tương tự. Các chế phẩm và dạng bào chế này cần chứa ít nhất là 0,1% hoạt chất. Tất nhiên, tỷ lệ của chế phẩm và dạng bào chế này có thể khác nhau và có thể thay đổi từ khoảng 1% đến khoảng 99% theo trọng lượng của dạng liều đơn vị nhất định. Trong các chế phẩm hữu ích về mặt trị liệu này, hoạt chất ở lượng sao cho có thể thu được mức liều hữu hiệu.

Viên nén, viên ngậm, viên tròn, viên nang, v.v. cũng có thể chứa: chất liên kết, như nhựa tragacan, acacia, bột ngô, hoặc gelatin; tá dược, như dicanxi hydro phosphat; tá dược rã, như bột ngô, bột khoai tây, axit alginic, v.v.; tá dược trơn, như magie stearat; và chất tạo ngọt, như sucroza, fructoza, lactoza, hoặc aspartam; hoặc hương liệu, như bạc hà, tinh dầu lộc đề xanh, hoặc hương vị quả anh đào. Khi dạng liều đơn vị là viên nang, nó có thể chứa, ngoài các nguyên liệu của loại nêu trên, chất mang lỏng, như dầu thực vật hoặc polyetylen glycol. Các nguyên liệu khác có thể có mặt ở dạng lớp phủ hoặc theo cách khác làm thay đổi trạng thái vật lý của dạng liều đơn vị rắn. Ví dụ, viên nén, viên tròn hoặc viên nang có thể được phủ bằng gelatin, sáp, sen-lắc (shellac), hoặc đường và chất tương tự. Siro hoặc còn ngọt có thể chứa các hoạt chất, sucroza hoặc fructoza làm chất tạo ngọt, metyl hoặc propyl paraben làm chất bảo quản, thuốc nhuộm và hương liệu (như vị quả anh đào hoặc vị cam). Tất nhiên, nguyên liệu bất kỳ được sử dụng để điều chế dạng liều đơn vị bất kỳ phải là được dụng và về cơ bản không độc với lượng được sử dụng. Ngoài ra, các hoạt chất có thể được kết hợp vào dạng bào chế giải phóng duy trì và thiết bị giải phóng duy trì.

Chất hoạt tính còn có thể được sử dụng trong tĩnh mạch hoặc trong màng bụng bằng cách truyền hoặc tiêm. Dung dịch nước chứa các hoạt chất hoặc muối của chúng có thể được điều chế, tùy ý trộn với chất hoạt động bề mặt không độc. Các chất phân tán còn có thể được điều chế trong glyxerol, polyetylen glycol lỏng, triaxetin, và hỗn hợp của chúng và trong dầu. Trong điều kiện bảo quản và sử dụng thông thường, các chế phẩm này chứa chất bảo quản để ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật.

Dạng liều được thích hợp để tiêm hoặc truyền có thể bao gồm dung dịch nước hoặc chất phân tán vô trùng hoặc bột vô trùng chứa hoạt chất (tùy ý được bao trong liposom) thích hợp cho chế phẩm giải phóng tức thì trong dung dịch hoặc chất phân tán có thể tiêm được hoặc có thể truyền được vô trùng. Ở tất cả các trường hợp, dạng liều

cuối cùng phải được vô trùng, dạng lỏng, và ổn định ở các điều kiện sản xuất và bảo quản. Chất mang lỏng có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán lỏng chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng, và tương tự), dầu thực vật, glyxerit không độc, và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ chảy thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách tạo liposom, bằng cách duy trì kích cỡ hạt mong muốn trong trường hợp các chất phân tán, hoặc bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Việc ngăn chặn vi sinh vật có thể đạt được nhờ nhiều chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clorobutanol, phenol, axit sorbic, thimerosal, và chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm các chất đẳng trương như đường, chất đệm hoặc natri clorua. Việc hấp thu kéo dài của các chế phẩm tiêm được có thể đạt được là nhờ sử dụng các chất làm chậm hấp thu, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin.

Các dung dịch tiêm được vô trùng có thể được bào chế bằng cách kết hợp hoạt chất với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với nhiều thành phần khác nhau được liệt kê trên đây, nếu cần thiết, tiếp đó là làm vô trùng bằng cách lọc. Trong trường hợp là bột vô trùng để bào chế các dung dịch tiêm được vô trùng, các phương pháp bào chế được ưu tiên là kỹ thuật sấy khô chân không và làm khô lạnh, mà tạo ra bột chứa hoạt chất cộng với các thành phần cần thiết bổ sung bất kỳ có trước đó trong dung dịch được lọc vô trùng.

Chất mang rắn hữu ích bao gồm các chất rắn nghiền thành bột (ví dụ, talc, đất sét, xenluloza vi tinh thể, silic oxit, nhôm oxit, và tương tự). Chất mang lỏng hữu ích bao gồm nước, etanol hoặc etylen glycol, hoặc hỗn hợp nước-etanol/etylen glycol, trong đó hợp chất theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc được phân tán ở nồng độ hữu hiệu, tùy ý với hỗ trợ của chất hoạt động bề mặt không độc. Các chất bổ trợ (ví dụ, hương thơm) và chất kháng khuẩn bổ sung có thể được bổ sung để tối ưu hóa các đặc tính cho mục đích sử dụng nhất định.

Chất làm đầy (như polyme tổng hợp, axit béo, muối của axit béo và este, rượu béo, xenluloza được cải biến hoặc các nguyên liệu vô cơ được cải biến) còn có thể được sử dụng với chất mang lỏng để tạo thành bột nhão, gel, thuốc mỡ, xà phòng, v.v. có khả năng bôi trơn, có thể được sử dụng trực tiếp lên da của người sử dụng.

Các chế phẩm nêu trên có thể có ở dạng liều đơn vị, là các đơn vị riêng biệt về

mặt vật lý chứa các liều lượng dạng đơn vị, thích hợp để sử dụng cho cơ thể người và động vật có vú khác. Dạng liều đơn vị có thể là một viên nang hoặc viên nén, hoặc nhiều viên nang hoặc viên nén. Tùy thuộc vào phương pháp điều trị cụ thể liên quan, lượng hoạt chất trong liều đơn vị có thể thay đổi hoặc được điều chỉnh từ khoảng 0,1 đến khoảng 1000 mg hoặc lớn hơn.

Ngoài ra, còn bao gồm ứng dụng nhiều dạng liều dược chất mới như lacto-liposom, vi cầu và nano cầu, như sử dụng hệ phân tán hạt micro bao gồm mixen polyme, nhũ tương nano, nhũ tương submicron, vi nang, vi cầu, liposom và niosom (còn được biết đến là bột khí hoạt động bề mặt không ion).

Thuật ngữ "điều trị" như được sử dụng ở đây thường đề cập đến việc thu được tác dụng dược lý và/hoặc sinh lý mong muốn. Tác dụng này có thể là phòng ngừa về mặt ngăn ngừa hoàn toàn hoặc một phần bệnh hoặc triệu chứng của nó; và/hoặc có thể là điều trị về mặt làm ổn định hoặc chữa khỏi một phần hoặc hoàn toàn bệnh và/hoặc tác động bất lợi do bệnh này. "Điều trị" như được sử dụng ở đây bao gồm việc điều trị bệnh bất kỳ ở bệnh nhân, bao gồm: (a) ngăn ngừa bệnh hoặc triệu chứng ở bệnh nhân dễ mắc bệnh hoặc tình trạng nhưng chưa được chẩn đoán; (b) ức chế các triệu chứng của bệnh, tức là, ngăn ngừa sự phát triển của nó; hoặc (c) cải thiện triệu chứng của bệnh, tức là, làm cho bệnh hoặc triệu chứng thuyên giảm.

Theo sáng chế, "đối tượng" đề cập đến động vật có xương sống. Theo các phương án nhất định, động vật có xương sống đề cập đến động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gia súc (như trâu bò), thú nuôi (như mèo, chó, và ngựa), linh trưởng, chuột nhắt, và chuột cống. Theo các phương án nhất định, động vật có vú là người.

Theo sáng chế, "lượng hữu hiệu" đề cập đến lượng hữu hiệu để đạt được tác dụng trị liệu hoặc phòng ngừa mong muốn ở liều lượng và thời gian cần thiết. "Lượng hữu hiệu điều trị" của chất/phân tử theo sáng chế có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi, giới tính và trọng lượng của cá thể và khả năng gây ra đáp ứng mong muốn của chất/phân tử ở cá thể. Lượng hữu hiệu điều trị bao gồm lượng trong đó hệ quả gây độc hoặc gây hại bất kỳ của chất/phân tử không trội bằng tác dụng có lợi cho việc điều trị. "Lượng hữu hiệu phòng ngừa" đề cập đến lượng hữu hiệu ở liều lượng và thời gian cần thiết để đạt được hiệu quả phòng ngừa mong muốn. Thông thường, nhưng

không cần thiết, lượng hữu hiệu phòng ngừa sẽ nhỏ hơn lượng hữu hiệu điều trị vì liều lượng phòng ngừa được sử dụng cho đối tượng trước khi khởi phát bệnh hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh. Trong trường hợp bệnh ung thư, lượng hữu hiệu điều trị của được chất làm giảm số lượng tế bào ung thư; thu nhỏ kích thước khối u; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó, tốt hơn là làm dừng) sự xâm nhập của tế bào ung thư vào các cơ quan xung quanh; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó, tốt hơn là làm dừng) sự di căn của khối u; ức chế sự sinh trưởng của khối u ở mức độ nào đó; và/hoặc giảm nhẹ một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư ở mức độ nào đó.

Theo sáng chế, 20 axit amin thông thường và chữ viết tắt của chúng theo cách sử dụng thông thường. Xem Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" đề cập đến kháng thể trong đó trình tự vùng biến đổi có nguồn gốc từ một loài và trình tự vùng hằng định có nguồn gốc từ một loài khác, như kháng thể trong đó các trình tự vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể chuột và trình tự vùng hằng định có nguồn gốc từ kháng thể người.

Kháng thể "được làm tương thích với người" đề cập đến các dạng kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) mà là globulin miễn dịch khảm, chuỗi globulin miễn dịch, hoặc các mảnh của chúng (ví dụ, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc các trình tự ngắn liên kết kháng nguyên khác của kháng thể) chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Tốt hơn là, kháng thể được làm tương thích với người là globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc của vùng quyết định bổ sung (CDR) của kháng thể nhận có nguồn gốc từ các thay thế gốc CDR của loài không phải người có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng (kháng thể cho) mong muốn như chuột nhất, chuột cống hoặc thỏ.

Ngoài ra, trong quá trình làm tương thích với người, cũng có thể gây đột biến gốc axit amin trong vùng CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 của VH và/hoặc VL, từ đó cải thiện một hoặc nhiều đặc tính liên kết (ví dụ, ái lực) của kháng thể. Ví dụ, sự phát sinh đột biến qua trung gian PCR có thể được thực hiện để đưa các đột biến mà tác dụng của nó trên khả năng liên kết kháng thể hoặc các đặc điểm chức năng khác có thể được đánh

giá bằng cách các thử nghiệm in vitro hoặc in vivo được mô tả ở đây. Thông thường, các thể đột biến bảo toàn được đưa vào. Các thể đột biến này có thể là thay thế, bổ sung hoặc xóa đoạn axit amin. Ngoài ra, thường có không nhiều hơn một hoặc hai thể đột biến trong CDR. Theo đó, kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể chứa 1 hoặc 2 thể đột biến axit amin trong CDR.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được làm rõ thêm dưới đây bằng các ví dụ cụ thể, nhưng các ví dụ này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Điều chế kháng thể được làm tương thích với người

1. Điều chế kháng thể đơn dòng kháng Claudin 18.2

Nhiều chiến lược được sử dụng đồng thời để gây miễn dịch chuột Balb/c và sàng lọc để thu được kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với chỉ Claudin 18.2, không liên kết đặc hiệu với Claudin 18.1, biến thể ghép nối khác của Claudin 18, như sau:

1) Cấu trúc của dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định biểu hiện Claudin 18.2

Plasmid Claudin 18.1-puc57-Amp (SynbioTech) chứa trình tự gen có chiều dài đầy đủ của Claudin 18.1 người (UniProtKB-P56856) được tổng hợp. Sử dụng plasmid này làm mẫu, đoạn mỗi ngược dòng 5'-ttggcaaagaattgctagatgtccaccaccacatgcc-3' (SEQ ID NO: 171), và đoạn mỗi xuôi dòng 5'-tgttcggggcctcctcgattacacatagtcgtgcttgg-3' (SEQ ID NO: 172), chiều dài đầy đủ của mảnh Claudin 18.1 của người (Met1-Val261) được khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm được khuếch đại được thất enzym bằng hỗn hợp cái tập hợp ADN NEBuilder HiFi (NEB, Cat: M0530L), và sau đó được tách dòng thành hệ plasmid biểu hiện nhân thực. Tương tự, plasmid Claudin 18.2-puc57-Amp (SynbioTech) chứa trình tự gen có chiều dài đầy đủ của Claudin 18.2 người (UniProtKB-P56856-2) được tổng hợp. Sử dụng plasmid này làm mẫu, đoạn mỗi ngược dòng 5'-ttggcaaagaattgctagatggccgtgactgcctgtc-3' (SEQ ID NO: 173), và đoạn mỗi xuôi dòng 5'-tgttcggggcctcctcgattacacatagtcgtgcttgg-3' (SEQ ID NO: 174), chiều dài đầy đủ của mảnh Claudin 18.2 của người (Met1-Val261) được khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm được khuếch đại được thất enzym bằng hỗn hợp cái tập hợp ADN NEBuilder HiFi (NEB, Cat. No.: M0530L), và sau đó được tách dòng thành hệ plasmid biểu hiện nhân thực. Các tế bào NIH3T3 và HEK293 lần lượt được điện hóa với plasmid này, và 1-10 µg/mL

Puromycin (Gibco, Cat. No.: A1113803) được sử dụng để sàng lọc có gia áp từng bước để thu được dòng tế bào biểu hiện ổn định.

Dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 thu được biểu hiện Claudin 18.1 và dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 đầu tiên được xác thực bằng phương pháp RT-PCR. ARN toàn phần được chiết từ dòng tế bào dương tính với kit chiết Trizol ARN, và kit phiên mã ngược (hệ thống tổng hợp sợi thứ nhất SuperScript™, Cat. No.: 18080051) được sử dụng để thu được thư viện cADN bằng cách phiên mã ngược với đoạn mồi Oligo (dT). Vì hai mảnh ghép nối của Claudin, Claudin 18.1 và 18.2 khác nhau ở vùng từ đầu cùng N đến miền ngoại bào thứ nhất (vòng 1), đoạn mồi KNB14 (5'-tgtgcgccaccatggccgtg-3' (SEQ ID NO: 175)) và KNB15 (5'-tggaaggataagattgtacc-3' (SEQ ID NO: 176)) được thiết kế, mà có thể khuếch đại vùng (504bp) từ vòng 1 đến đầu cùng C (không bao gồm vòng 1) của Claudin 18.1 và Claudin 18.2; đoạn mồi KNB16 (5'-tgggtgccattggcctctg-3' (SEQ ID NO: 177) được thiết kế, mà có thể liên kết đặc hiệu và bổ sung với đầu cùng N của Claudin 18.2, nhưng không liên kết với đầu cùng N của Claudin 18.1, và chỉ mảnh có chiều dài đầy đủ (780 bp) của Claudin 18.2 từ đầu cùng N đến đầu cùng C được khuếch đại, và tế bào KATO III (ATCC HTB-103) biểu hiện Claudin 18.2 được sử dụng làm đối chứng dương. Như được thể hiện trên Fig. 1, RT-PCR cho thấy rằng dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 lần lượt biểu hiện Claudin 18.1 và Claudin 18.2. Cả dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 và tế bào KATO III đối chứng có thể khuếch đại dải đặc trưng 780bp đặc hiệu đối với Claudin 18.2, trong khi HEK293 biểu hiện Claudin 18.1 có thể chỉ khuếch đại mảnh 504bp dùng chung.

Các dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định tế bào HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 và tế bào NIH3T3 biểu hiện Claudin 18.2 được tiêu hóa và thu thập, rửa hai lần bằng PBS, và ủ bằng 100 µL kháng thể sơ cấp kháng Claudin 18.2 của thỏ được pha loãng 1:200 (Abcam, EPR19202, Cat: ab222512) ở nhiệt độ 4°C trong 60 phút. Dung dịch kháng thể sơ cấp dư được rửa bằng 0,5% BSA/PBS, và 50 µL kháng thể thứ cấp của dê kháng IgGfc-AF647 thỏ (Jackson ImmunoResearch, Cat: 111-606-046), được thêm và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 45 phút. Kháng thể thứ cấp dư được rửa bằng 0,5% BSA/PBS, và cuối cùng tế bào được tái tạo huyền phù bằng 100 µL dung dịch PBS, và được phát hiện ngay lập tức bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 2 và Fig. 3.

Fig. 2 thể hiện các kết quả của dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293-Claudin 18.2 được chuyển nhiễm bằng gen Claudin 18.2 có chiều dài đầy đủ được phát hiện bởi FACS. Các chấm đen là tế bào HEK293 không được chuyển nhiễm, và các chấm xám là tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2. Tế bào HEK293 không biểu hiện Claudin 18.2, và tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293-Claudin 18.2 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức cao trên bề mặt tế bào.

Fig. 3 thể hiện các kết quả của Claudin 18.2 trong dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định NIH3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao được phát hiện bởi FACS. Vạch đen là đối chứng âm, và phần tô xám là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2. NO.32-H là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao, NO.18-M là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ vừa phải, và NO. 6-L là dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ thấp.

Dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định dương mà đã được mở rộng được thu thập và làm đông lạnh, và dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định NIH3T3 biểu hiện Claudin 18.2 được sử dụng để gây miễn dịch cho động vật.

2) Điều chế kháng thể đơn dòng kháng Claudin 18.2 từ tế bào lai

Chuột Balb/c cái 6-8 tuần tuổi được gây miễn dịch bằng tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện claudin 18.2 hoặc plasmit mã hóa Claudin 18.2, tương ứng, hoặc luân phiên. Khi gây miễn dịch bằng các tế bào, 1×10^6 tế bào chuyển nhiễm ổn định 3T3 biểu hiện claudin 18.2 được trộn với chất bổ trợ Freund hoặc chất bổ trợ không phải Freund mỗi lần, sau đó được tiêm vào gốc đuôi và bàn chân, và quá trình gây miễn dịch được thực hiện lại ở các vị trí khác hai tuần sau đó. Khi ADN được sử dụng để gây miễn dịch, 20 μ g plasmit được trộn với 1 μ g CpG, và sau đó tiêm trực tiếp vào bụng của chuột bằng súng bắn gen (Biorad) ở 40 psi, và quá trình gây miễn dịch được thực hiện một lần/tuần. Ba ngày trước khi hợp nhất, dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 ở mức độ cao được sử dụng để tiêm tĩnh mạch tai bằng 1×10^6 tế bào/50 μ L cho mỗi chuột để gây miễn dịch xung. Ba ngày sau, chuột được giết, và hạch bạch huyết vùng khoeo, bẹn và xương chậu được thu thập và nghiền trong DMEM để thu được huyền phù giàu tế bào B; loại bỏ lách chuột, nghiền trong DMEM, và quay ly tâm để thu được huyền phù tế bào lách. Lượng thích hợp của hỗn hợp hạch bạch huyết

và huyền phù tế bào lách được trộn với SP2/0, và các tế bào được hợp nhất bằng cách sử dụng thiết bị hợp nhất bằng điện.

3) Cấu trúc của thư viện kháng thể thực khuẩn kháng Claudin 18.2

Một phần của lách chuột và huyền phù tế bào hạch bạch huyết ngoại vi đã thu thập được sử dụng để chiết ARN toàn phần bằng kit chiết ARN Trizol, và phiên mã ngược được tiến hành bằng kit phiên mã ngược (hệ thống tổng hợp sợi thứ nhất SuperScript, Cat. No. 18080051) với các đoạn môi đặc hiệu chuỗi nhẹ và chuỗi nặng để lần lượt tạo ra thư viện cADN chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể. Sử dụng thư viện cADN này làm mẫu, các đoạn môi của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được dùng để khuếch đại các mảnh của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nặng kháng thể bằng PCR, và sau khi tiêu hóa enzym, các sản phẩm PCR được tách dòng thành vector plasmit thể thực khuẩn chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ kháng thể Ckapa của người hoặc vùng hằng định chuỗi nặng CH1 IgG1 của người, lần lượt tạo thành thư viện chuỗi nhẹ và thư viện chuỗi nặng thể khám. Các mảnh kháng thể trong thư viện chuỗi nhẹ được tiêu hóa hai lần bằng BspQI và SfiI, và sau đó được buộc vào thư viện chuỗi nặng để tạo thành thư viện biểu hiện thể thực khuẩn Fab thể khám ở chuột dựa trên thể thực khuẩn dạng sợi M13, với dung tích thư viện là $1,2 \times 10^{10}$. Lấy 0,8 mL thể thực khuẩn (chuẩn độ khoảng 1×10^{13} /mL) và trộn với 200 μ L 5% BSA/PBS, được thêm 1×10^7 tế bào HEK293 biểu hiện claudin 18.1, và đặt trong bồn nước đá trong 1 giờ; sau khi ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 10 phút, chất nổi bề mặt thu thập được được trộn với 1×10^6 tế bào HEK293 biểu hiện Claudin 18.2, ngâm bồn đá trong 1 giờ, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 3 phút, và loại bỏ chất nổi bề mặt; 1 mL 1% BSA/PBS được thêm, và rửa lặp lại 5-10 lần; 1 mL 100 mM TEA được thêm để ly giải tế bào, thêm 0,5 mL 1M Tris-HCl, pH 7,5 được thêm để trung hòa sau khi ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, và 10 mL TG1 *E. coli* trong pha sinh trưởng logarit được sử dụng để lây nhiễm thể thực khuẩn ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Theo các quy trình thông thường của sinh học phân tử, các thể thực khuẩn được phục hồi, việc chuẩn độ được phát hiện và vòng quét tiếp theo được thực hiện.

2. Sàng lọc và thu thập trình tự của các kháng thể đặc hiệu kháng Claudin 18.2

HEK293 biểu hiện Claudin 18.1, HEK293 biểu hiện Claudin 18.2, và tế bào HEK293 lần lượt được nhuộm trước bằng thuốc nhuộm Cell Tracker Green CMFDA 5

μM , $0,5 \mu\text{M}$, và $0 \mu\text{M}$ (Thermo, Cat. No.: C2925), theo các hướng dẫn nhuộm tế bào sống. Sau khi rửa thuốc nhuộm, các tế bào được trộn ở tỷ lệ 1:1:1, thêm vào đĩa 96 giếng (2×10^5 tế bào/giếng), kết hợp với chất nổi bề mặt tế bào lai hoặc chất nổi bề mặt thu được bằng cách cảm ứng vi khuẩn và ủ trong bồn nước đá trong 1 giờ. Kháng thể thứ cấp được gắn nhãn AlexaFluor647 kháng IgG Fc của chuột hoặc kháng IgG F(ab)'₂ của người (Jackson ImmunoResearch) được thêm, và ủ trên nước đá trong 45 phút. Sau khi rửa, $100 \mu\text{L}$ PBS được thêm vào mỗi giếng để tái tạo huyền phù tế bào, tế bào được phân tích bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng (thiết bị sàng iQue), ba quần thể tế bào khác nhau được khoanh tròn theo sự khác biệt về cường độ huỳnh quang của kênh FL2, và sau đó khả năng liên kết của kháng thể được thử nghiệm với mỗi quần thể tế bào trong kênh FL4 được phát hiện. Kháng thể đã sàng lọc liên kết với tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 có ái lực và tính đặc hiệu cao, và không liên kết với tế bào chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.1 hoặc tế bào HEK293. Từ các tế bào thể lai, tổng 320 dòng vô tính được sàng lọc bằng FACS và 320 dòng vô tính này có thể liên kết với Claudin 18.2, nhưng không liên kết với Claudin 18.1; sau 3 vòng quét, 62 dòng vô tính được chọn từ thư viện thể thực khuẩn Fab và 62 dòng vô tính này liên kết với Claudin 18.2 với có ái lực cao nhưng không liên kết với Claudin 18.1.

Các plasmit được chiết từ dòng vô tính dương được sàng lọc từ thư viện thể thực khuẩn để giải trình tự, và trình tự vùng biến đổi được tách dòng thành các vector vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, tương ứng, để biểu hiện IgG có chiều dài đầy đủ. Các tế bào dương thu được từ tế bào lai được dung giải bằng cách thêm 1 mL TRNzol, và ARN toàn phần được chiết bằng phương pháp guanidin thioxyanat. Dung hỗn hợp này làm mẫu, sau khi tổng hợp cADN sợi thứ nhất, cADN sợi thứ nhất được sử dụng làm mẫu tiếp theo để khuếch đại trình tự ADN của vùng biến đổi tương ứng với các tế bào thể lai. Sau khi giải trình tự các sản phẩm được khuếch đại, thu được trình tự vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các tế bào lai ứng viên, như được thể hiện dưới đây.

Dòng vô tính 18D10:

Chuỗi nặng

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT GYSITSNYAWN WIRQFPGNKLEWMG

YINYSGNTNYPNPSLKS RISITRDTSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCAT
SYYGNSFIY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 139).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 140), CDR2 (SEQ ID NO: 141), CDR3 (SEQ ID NO: 142) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 143), FR2 (SEQ ID NO: 144), FR3 (SEQ ID NO: 145), và FR4 (SEQ ID NO: 146) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCT
 CTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTAATTATGCCT
 GGAAGTGGATCCGACAGTTTCCAGGAAACAACTAGAGTGGATGGGCTAC
 ATAAACTACAGTGGGAACACTAACTATAACCCATCTCTCAAAAGTCGAAT
 CTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTC
 TGTGACTGCTGAGGACACAGCCACATATTATTGTGCAACCTCCTATTATGG
 TAATTCCTTTATTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 (SEQ ID NO: 178).

Chuỗi nhẹ

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPL
 LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAYSFPWTFG
 GGTKLEIK (SEQ ID NO: 147).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 148), CDR2 (SEQ ID NO: 149), CDR3 (SEQ ID NO: 150) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 151), FR2 (SEQ ID NO: 152), FR3 (SEQ ID NO: 153), và FR4 (SEQ ID NO: 154) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAG
 AAGGTCATATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAA
 TCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTA
 AACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAGTCTGGGGTCCCTGATCGCT
 TCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGC
 AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGCTTATAGTTTTCCGT

GGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:179).

Dòng vô tính 18A9:

Chuỗi nặng

QVQLQQSGREVVRPGTGVKVSCKPSGYAFTNYLIDWVKQRPGQGLEWIGGIN
PGSGDTVYNEKFKAKATLTADKSSMTANMQLSSLTSDDSA VYFCARRVRGNS
FDSWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 155).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 156), CDR2 (SEQ ID NO: 157), CDR3 (SEQ ID NO: 158) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 159), FR2 (SEQ ID NO: 160), FR3 (SEQ ID NO: 161), FR4 (SEQ ID NO: 162) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGACGTGAGGTGGTAAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGATACGCCTTCTACTAATTACTTGAT
AGACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGGGA
TTAATCCTGGAAGTGGTGACACTGTGTACAATGAGAAGTTCAAGGCCAAG
GCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCATGACTGCCAACATGCAGCTCAG
CAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGCGCAAGAAGGGTCCG
TGGTAATTCGTTTGATTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGC
A (SEQ ID NO:180).

Chuỗi nhẹ

DIVMSQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGKDFTLTISVQAEDLALYYCQNNYFYPLTFG
AGTKLELK (SEQ ID NO: 163).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 164), CDR2 (SEQ ID NO: 165), CDR3 (SEQ ID NO: 166) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 167), FR2 (SEQ ID NO: 168), FR3 (SEQ ID NO: 169), và FR4 (SEQ ID NO: 170) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAG

AAGGTCACCTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGA
 TCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTA
 AATTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT
 TCACAGGCAGTGGATCTGGAAAAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGC
 AGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTCAGAATAATTATTTTATCCGCT
 CACGTTCTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:181).

Các mảnh trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên được khuếch đại bằng PCR, và vùng biến đổi chuỗi nặng được tách dòng thành vector chứa vùng hằng định chuỗi nặng của người để biểu hiện chuỗi nặng IgG1 nguyên vẹn ở tế bào động vật có vú. Tương tự, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được tách dòng thành vector chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ của người để biểu hiện chuỗi nhẹ kappa hoàn chỉnh ở tế bào động vật có vú. Sau khi xác minh trình tự, chúng được chuyển nhiễm thành các tế bào HEK293-6E của động vật có vú, IgG1 được biểu hiện và tiết vào môi trường, và chất nổi bề mặt được thu thập, lọc và sau đó được tinh chế. IgG được tinh chế bằng sắc ký Protein A, và chất nổi bề mặt nuôi cấy được tải lên cột Protein A được định cỡ thích hợp, rửa bằng 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, và IgG liên kết được rửa giải bằng 0,1 M Glyxin-HCl, pH 3,0. Protein được cô đặc bằng cách siêu lọc sử dụng ống cô đặc (Millipore), và nồng độ của IgG được xác định bằng cách đo quang phổ thông qua phát hiện OD280. Phân tinh chế của IgG được phân tích bằng SDS-PAGE.

HEK293 biểu hiện Claudin 18.1, HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 và tế bào HEK293 được thu hoạch trong pha sinh trưởng logarit, sau khi chúng được tiêu hóa, 5×10^4 tế bào/100 μ L được thêm vào đĩa 96 giếng hình chữ U, ly tâm ở tốc độ 1100 vòng/phút trong 3 phút, sau đó chất nổi bề mặt được loại bỏ. Các tế bào được gõ nhẹ, và 50 μ L kháng thể được pha loãng tuần tự được thêm vào mỗi giếng (nồng độ kháng thể bắt đầu từ 100 nM, pha loãng 5 lần cho 8 gradien), và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, 140 μ L 0,5% BSA được thêm vào mỗi giếng để rửa 3 lần, và 30 μ L/giếng kháng thể thứ cấp AlexaFluro647 kháng IgG của người (Jackson ImmunoResearch, Cat: 109-606-170) được thêm vào, và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 40 phút. Sau khi ủ, 140 μ L 0,5% BSA được thêm vào mỗi giếng để rửa 3 lần, và cuối cùng mỗi giếng được tái tạo huyền phù trong 50 μ L PBS để phát hiện bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng (thiết bị sàng iQue). Như được thể hiện trong Bảng 1, các kết quả cho thấy rằng kháng thể IgG1 Claudin 18.2 thể khả năng chỉ nhận diện tế bào HEK293 chuyển nhiễm với gen Claudin

18.2 biểu hiện Claudin 18.2, nhưng không có khả năng liên kết với HEK293 hoặc HEK293 biểu hiện Claudin 18.1.

Bảng 1: Khả năng liên kết của kháng thể Claudin 18.2 với dòng tế bào chuyển nhiễm ổn định (N.B. biểu thị không phát hiện thấy liên kết)

mAb	Claudin 18.2	Claudin 18.1	HEK293
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
Dòng vô tính 18D10	0,37	N.B.	N.B.
Dòng vô tính 18A9	0,31	N.B.	N.B.

3. Quá trình làm tương thích với người của kháng thể kháng Claudin 18.2

Trình tự vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng được chọn được căn chỉnh với trình tự kháng thể dòng mầm của người để tìm ra trình tự có tính tương đồng cao để ghép CDR; sau đó, thực hiện tạo mô hình tương đồng in silico để phân tích vùng CDR và trình tự axit amin khung bao quanh của nó để nghiên cứu chế độ liên kết không gian ba chiều của nó. Bằng cách tính lực tĩnh điện, lực van der Waals, tính kỵ nước và giá trị entropy, các gốc axit amin chính, mà có thể tương tác với đích và duy trì khung không gian, ở mỗi trình tự gen của kháng thể đơn dòng dương tính được phân tích, và các vị trí đột biến ngược được thiết kế theo đó. Ái lực HLA-DR được phân tích và trình tự khung dòng mầm của người có ít khả năng sinh miễn dịch được chọn. Các gốc axit amin mà có thể được cải biến trong khi lên men được phân tích và các thể đột biến được thiết kế để làm giảm khả năng cải biến.

Các dẫn xuất chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau được thiết kế. Sau khi tổng hợp trình tự đầy đủ của các dẫn xuất chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, chúng được tách dòng thành vectơ chứa vùng hằng định Ckapa của chuỗi kapa kháng thể hoặc vùng hằng định CH1-CH3 của IgG1 của người. Sau khi các plasmit mang các dẫn xuất chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có cùng nguồn gốc từ cha mẹ tương ứng được ghép cặp, các tế bào HEK293.6E được chuyển nhiễm để biểu hiện kháng thể trong 5-6 ngày, và chất nổi bề mặt được thu thập và tinh chế trên cột Protein A.

Các trình tự của kháng thể được làm tương thích với người như sau:

18D10:

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

18D10VHv1:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GYSITSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGNTNYPNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT
SYYGNSFIY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO:2), CDR2 (SEQ ID NO:3), CDR3 (SEQ ID NO:4) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 5), FR2 (SEQ ID NO: 6), FR3 (SEQ ID NO: 7), và FR4 (SEQ ID NO: 8) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCATCACCAGCAACTACGC
 CTGGAACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCT
 ACATCAACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGA
 GTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
 CAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACT
 ACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTT
 CT (SEQ ID NO: 182).

18D10VHv2:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWMG
YINYSGNTNYPNPSLKS RITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT
SYYGNSFIY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 11), CDR3 (SEQ ID NO: 12) từ trái sang phải;

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 13), FR2 (SEQ ID NO: 14), FR3 (SEQ ID NO: 15), và FR4 (SEQ ID NO: 16) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACG

CCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATGGGC
TACATCAACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAG
AATCACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
GCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTAC
TACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCT
TCT (SEQ ID NO: 183).

18D10VHv3:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGNTNYPNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT
SYYGNSFIY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 19), CDR3 (SEQ ID NO: 20) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 21), FR2 (SEQ ID NO: 22), FR3 (SEQ ID NO: 23), và FR4 (SEQ ID NO: 24) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACG
CCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCAACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAG
AGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
GCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTAC
TACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCT
TCT (SEQ ID NO: 184).

18D10VHv4:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGYTNYPNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT
SYYGNSFIY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 27), CDR3 (SEQ ID NO: 28) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 29), FR2 (SEQ

ID NO: 30), FR3 (SEQ ID NO: 31), và FR4 (SEQ ID NO: 32) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACG
 CCTGGAACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
 TACATCAACTACAGCGGCTACACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAG
 AGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
 GCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTAC
 TACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCT
 TCT (SEQ ID NO: 185).

18D10VHv5:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGNTAYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT
SYYGNSFIY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO:34), CDR2 (SEQ ID NO:35), CDR3 (SEQ ID NO:36) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 37), FR2 (SEQ ID NO: 38), FR3 (SEQ ID NO: 39), và FR4 (SEQ ID NO: 40) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACG
 CCTGGAACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
 TACATCAACTACAGCGGCAACACCGCCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAG
 AGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
 GCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTAC
 TACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCT
 TCT (SEQ ID NO: 186).

18D10VHv6:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YIYYSGNTNPNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT

SYYGNSFIY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2 (SEQ ID NO: 43), CDR3 (SEQ ID NO: 44) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 45), FR2 (SEQ ID NO: 46), FR3 (SEQ ID NO: 47), FR4 (SEQ ID NO: 48) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACG
CCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCTACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAG
AGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
GCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTAC
TACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCT
TCT (SEQ ID NO: 187).

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

18D10VLv1:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

KSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIY

WASTRES

GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QNAYSFPWT FGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 49).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 50), CDR2 (SEQ ID NO: 51), CDR3 (SEQ ID NO: 52) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 53), FR2 (SEQ ID NO: 54), FR3 (SEQ ID NO: 55), và FR4 (SEQ ID NO: 56) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCA
ACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG

ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCT
GCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGAACGCCTACAGCTTCCC
CTGGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 188).

18D10VLv2:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLLNSGNQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQAYSFPWT FGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 57).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 58), CDR2 (SEQ ID NO: 59), CDR3 (SEQ ID NO: 60) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 61), FR2 (SEQ ID NO: 62), FR3 (SEQ ID NO: 63), và FR4 (SEQ ID NO: 64) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCA
ACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG
ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCT
GCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGCAGGCCTACAGCTTCCC
CTGGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 189).

Các trình tự của kháng thể được làm tương thích với người ưu tiên như sau:

Trình tự axit amin chuỗi nặng:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKGLEWIGYIY
YSGNTNYPNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATSYYGNSFI
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN

VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:65).

Trình tự axit nucleic chuỗi nặng

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACG
 CCTGGAACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
 TACATCTACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAG
 AGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
 GCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTAC
 TACGGCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCT
 TCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
 AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT
 CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG
 TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
 GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
 ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC
 CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTGAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTG
 CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
 TACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 190).

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPL

IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSFPWTFGQ
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 66).

Trình tự axit nucleic chuỗi nhẹ

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCA
 ACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
 AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG
 ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCT
 GCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGAACGCCTACAGCTTCCC
 CTGGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTG
 CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
 CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
 GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
 GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
 TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
 GAGTGTTAG (SEQ ID NO: 191).

18A9:

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

18A9VHv1:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKPS GYAFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTLTADKSSMTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 67).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 68), CDR2 (SEQ ID NO: 69), CDR3 (SEQ ID NO: 70) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 71), FR2 (SEQ ID NO: 72), FR3 (SEQ ID NO: 73), FR4 (SEQ ID NO: 74) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACGCCTTCACCAACTACCTGAT
CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCATGACCGCCTACATGGAAGTGAAG
CAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGC
GGGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTT
CT (SEQ ID NO: 192).

18A9VHv2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARRVRG
NSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 75).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 76), CDR2 (SEQ ID NO: 77), CDR3 (SEQ ID NO: 78) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 79), FR2 (SEQ ID NO: 80), FR3 (SEQ ID NO: 81), và FR4 (SEQ ID NO: 82) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGAT
CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGCCGACGAGTCTACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAG
CAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGC
GGGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTT
CT (SEQ ID NO: 193).

18A9VHv3:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQGRVTLTADKSSMTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVR
GNSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 83).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 84), CDR2

(SEQ ID NO: 85), CDR3 (SEQ ID NO: 86) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 87), FR2 (SEQ ID NO: 88), FR3 (SEQ ID NO: 89), và FR4 (SEQ ID NO: 90) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGAT
CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCATGACCGCCTACATGGAACTGAG
CAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGAGTGC
GGGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTT
CT (SEQ ID NO: 194).

18A9VHv4:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKAS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTLTADKSSMTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 91).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 92), CDR2 (SEQ ID NO: 93), CDR3 (SEQ ID NO: 94) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 95), FR2 (SEQ ID NO: 96), FR3 (SEQ ID NO: 97), và FR4 (SEQ ID NO: 98) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
CGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGAT
CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCATGACCGCCTACATGGAACTGAG
CAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGC
GGGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTT
CT (SEQ ID NO: 195).

18A9VHv5:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 99).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 100), CDR2 (SEQ ID NO: 101), CDR3 (SEQ ID NO: 102) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 103), FR2 (SEQ ID NO: 104), FR3 (SEQ ID NO: 105), và FR4 (SEQ ID NO: 106) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGAT
 CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
 TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
 GTGACCATCACCGCCGACGAGTCTACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAG
 CAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGC
 GGGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTT
 CT (SEQ ID NO: 196).

18A9VHv6:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKPS GYAFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDNAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 107).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 108), CDR2 (SEQ ID NO: 109), CDR3 (SEQ ID NO: 110) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 111), FR2 (SEQ ID NO: 112), FR3 (SEQ ID NO: 113), và FR4 (SEQ ID NO: 114) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACGCCTTCACCAACTACCTGAT
 CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
 TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
 GTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAG

CAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCG
GGGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCACCGTTTCTT
CT (SEQ ID NO: 197).

18A9VHv7:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 115).

Trong đó, các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 116), CDR2 (SEQ ID NO: 117), CDR3 (SEQ ID NO: 118) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 119), FR2 (SEQ ID NO: 120), FR3 (SEQ ID NO: 121), và FR4 (SEQ ID NO: 122) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAG
CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGAT
CGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCA
TCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGCCGACACCTCTACCAGCACCGTCTACATGGAAGTGAAGC
AGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCG
GGGCAACAGCTTCGATTCTTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCACCGTTTCTTC
T (SEQ ID NO: 198).

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

18A9VLv1:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLLNSGNQKNYLT
WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
GVPDRFSGSGSGKDFTLTISLQAEDVAVYYC QNNYFYPLT FGSGTKVEIK
(SEQ ID NO: 123).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là CDR1 (SEQ ID NO: 124), CDR2 (SEQ ID NO: 125), CDR3 (SEQ ID NO: 126) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 127), FR2 (SEQ

ID NO: 128), FR3 (SEQ ID NO: 129), và FR4 (SEQ ID NO: 130) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCA
ACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG
ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAAAGGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCT
GCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGAACAACCTACTTCTACCC
TCTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:199).

18A9VLv2:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNLSGNQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQNYFYPLT FGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 131).

Trong đó các phần được gạch chân lần lượt là tương ứng CDR1 (SEQ ID NO: 132), CDR2 (SEQ ID NO: 133), CDR3 (SEQ ID NO: 134) từ trái sang phải; và

Các phần không được gạch chân lần lượt là FR1 (SEQ ID NO: 135), FR2 (SEQ ID NO: 136), FR3 (SEQ ID NO: 137), và FR4 (SEQ ID NO: 138) từ trái sang phải.

Trình tự axit nucleic

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCA
ACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG
ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCT
GCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAACCTACTTCTACCC
TCTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 200).

Ví dụ 2. Nghiên cứu dược lý về kháng thể được làm tương thích với người

1. Xác định ái lực (EC_{50}) của kháng thể được làm tương thích với người

Thu hoạch các tế bào trong pha sinh trưởng logarit, phong bế bằng 3% BSA trong

30 phút, và đặt trong đĩa 96 giếng hình chữ U có mật độ 5×10^4 tế bào/100 μL . Ly tâm đĩa ở tốc độ 1100 vòng/phút trong 3 phút, và loại bỏ chất nổi bề mặt. Gỡ nhẹ đĩa để phân tán tế bào, và 50 μL kháng thể được pha loãng tuần tự (nồng độ kháng thể bắt đầu từ 100 nM, 8 gradien pha loãng 5 lần) được thêm vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, 140 μL 0,5% BSA được thêm vào mỗi giếng để rửa ba lần, và 30 μL /giếng kháng thể thứ cấp kháng kháng thể người AF 647/APC được thêm vào và ủ trong 40 phút ở nhiệt độ 4°C . Sau khi ủ, 140 μL 0,5% BSA được thêm vào mỗi giếng để rửa ba lần, và cuối cùng các tế bào trong mỗi giếng được tái tạo huyền phù trong 50 μL PBS để phân tích FACS bằng iQue (Intellicyt, USA) (xem Bảng 2).

Bảng 2: Các kết quả thử nghiệm ái lực đối với kháng thể được làm tương thích với người

Panen kháng thể (tên)	VL	VH	EC ₅₀ (nM)
18D10 khảm	18D10 mVL	18D10 mVH	2,068
h 18D10.v11	18D10VLv1	18D10VHv1	1,131
H18D10.v12	18D10VLv1	18D10VHv2	1,678
H18D10.v13	18D10VLv1	18D10VHv3	0,912
H18D10.v14	18D10VLv1	18D10VHv4	1,744
H18D10.v15	18D10VLv1	18D10VHv5	2,687
H18D10.v16	18D10VLv1	18D10VHv6	2,313
H18D10.v21	18D10VLv2	18D10VHv1	1,069
H18D10.v22	18D10VLv2	18D10VHv2	1,897
H18D10.v23	18D10VLv2	18D10VHv3	0,982
H18D10.v24	18D10VLv2	18D10VHv4	1,926
H18D10.v25	18D10VLv2	18D10VHv5	1,265
H18D10.v26	18D10VLv2	18D10VHv6	1,874
18A9 khảm	18A9 mVL	18A9 mVH	1,034
H18A9.v11	18A9VLv1	18A9VHv1	0,645
H18A9.v12	18A9VLv1	18A9VHv2	0,913
H18A9.v13	18A9VLv1	18A9VHv3	0,761
H18A9.v14	18A9VLv1	18A9VHv4	0,548
H18A9.v15	18A9VLv1	18A9VHv5	1,407
H18A9.v16	18A9VLv1	18A9VHv6	0,799
H18A9.v17	18A9VLv1	18A9VHv7	1,425
H18A9.v21	18A9VLv2	18A9VHv1	1,027
H18A9.v22	18A9VLv2	18A9VHv2	0,822
H18A9.v23	18A9VLv2	18A9VHv3	1,170
H18A9.v24	18A9VLv2	18A9VHv4	2,065
H18A9.v25	18A9VLv2	18A9VHv5	0,964
H18A9.v26	18A9VLv2	18A9VHv6	1,405
H18A9.v27	18A9VLv2	18A9VHv7	0,646

2. Hoạt tính tiêu diệt ADCC của kháng thể CM311 trên các tế bào khối u

30 mL máu tươi được đưa vào ống ly tâm 50 mL, thêm 15 mL 1×PBS, trộn kỹ, và hỗn hợp được thêm từ từ vào ống ly tâm mà đã được thêm 20 mL Ficoll-Paque Plus, sao cho máu được trải đều trên bề mặt của Ficoll-Paque Plus. Ống ly tâm được ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 20°C, loại bỏ phần huyết thanh trên cùng, lớp phủ đệm (buffy coat) (tức là PBMC) được hấp thụ, và chia vào các ống ly tâm 50mL với 10mL mỗi ống. Thêm vào mỗi ống với lượng không nhỏ hơn 30mL 1×PBS và trộn kỹ. Ống được ly tâm ở tốc độ 1300 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, chất nổi bề mặt được loại bỏ, và thêm 10 mL 1×PBS vào ống để rửa và đếm số lượng tế bào.

Các tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường FBS/RPMI 1640 và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂ trong 2 giờ. Môi trường được ly tâm ở tốc độ 1300 vòng/phút trong 10 phút, chất nổi bề mặt được loại bỏ, và tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường FBS/RPMI 1640 một lần nữa, và cấy trong đĩa 96 giếng hình chữ U, 4×10⁵ tế bào/giếng, 50 µL/giếng. Kháng thể 18D10 khảm, 18A9 khảm, kháng thể được làm tương thích với người kháng Claudin 18.2 18D10, 18A9 (tức là CM311, CM311 là tên chung của kháng thể được làm tương thích với người 18D10 hoặc 18A9) nêu trên và các dung dịch pha loãng của kháng thể kháng KLH đối chứng (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 µg/mL) được thêm vào, 25 µL/giếng. Các đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Lấy đĩa ra và thêm tế bào KATO III, 8×10³ tế bào/giếng, 25 µL/giếng. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO₂ trong 3,5 giờ, thêm 2 µL 10× đệm dung giải vào giếng giải phóng tối đa của tế bào đích, và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37°C bằng 5% CO₂ trong 30 phút. Lấy đĩa ra, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 3 phút, và chất nổi bề mặt được chuyển vào đĩa ELISA đen, 50 µL/giếng. Thêm 50µL/giếng chất nền phát hiện LDH, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, và thêm 25 µL/giếng dung dịch dừng để dừng phản ứng. OD (mật độ quang) được kiểm tra bằng máy đọc vi đĩa (Biotek).

Kết quả được tính như sau:

$$\% \text{ tiêu diệt tế bào} = (\text{OD}_{\text{thử nghiệm}} - \text{OD}_{\text{giải phóng đối chứng}}) / (\text{OD}_{\text{giải phóng tối đa}} - \text{OD}_{\text{giải phóng đối chứng}}) \times 100\%$$

Như được thể hiện trên Fig. 4, kháng thể kháng thể được làm tương thích với người kháng Claudin 18.2, 18D10 và 18A9 có hoạt tính ADCC mạnh.

3. Hoạt tính tiêu diệt tế bào CDC của kháng thể CM311 trên các tế bào khối u

Tế bào KATO III trong pha sinh trưởng logarit được tái tạo huyền phù ở mật độ 1×10^7 tế bào/mL. CFSE (Sigma, 87444-5MG-F) được thêm ở nồng độ cuối cùng là 1 μ M. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, và thêm 3 thể tích môi trường để làm dừng phản ứng. Ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút, loại bỏ chất nổi bề mặt, tái tạo huyền phù trong môi trường, và gieo các tế bào vào đĩa 96 giếng, 1×10^5 tế bào/giếng, 50 μ L/giếng. Thêm kháng thể 18D10 khả, 18A9 khả, kháng thể được làm tương thích với người kháng Claudin 18.2 18D10, 18A9 (CM311) và kháng thể đối chứng kháng KLH (các nồng độ pha loãng là 30, 10, 3,33, 1,11, 0,37 μ g/mL) đã pha loãng như nêu trên, 50 μ L/giếng. Các phân bổ sung được pha loãng đến 30% với môi trường, và thêm vào đĩa, 50 μ L/giếng. Ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 2 giờ, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 3 phút, và loại bỏ chất nổi bề mặt. Dung dịch nhuộm PI (pha loãng tỷ lệ 1:200) được trộn với sulfat latec (Invitrogen, S37227), và sau đó thêm vào đĩa 96 giếng, 100 μ L/giếng. Ủ trên nước đá trong 10 phút, và sau đó phân tích tế bào bằng FACS. Như được thể hiện trên Fig. 5, kháng thể được làm tương thích với người kháng Claudin 18.2 18D10 và 18A9 có tác dụng CDC mạnh.

Ví dụ 3. Điều chế và phân tích thể liên hợp kháng thể-dược chất

1. Điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất

10 mg kháng thể CM311 được trao đổi đệm bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc 15 mL 30 KD thành đệm khử (25 mM natri borat, pH 8,0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA) trong tổng cộng ba lần; thể tích cuối cùng khoảng 1 mL, chuyển vào ống ly tâm Eppendorf mới (đã cân), và cân; đo nồng độ protein và tính tổng lượng protein. 2,5 lần lượng mol của DTT được thêm vào kháng thể và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và trộn liên tục. Hỗn hợp được trao đổi đệm bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc 15 ml 30 KD thành đệm ghép đôi (50 mM Tris, pH 7,2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) trong tổng cộng ba lần. Thu dung dịch, đo bằng A₂₈₀ để xác định nồng độ protein, và cân, và tính tổng lượng protein. Lấy 10 μ L mẫu và đo bằng phương pháp Ellman để xác định số nhóm thiol tự do.

Ngoài ra, nồng độ mol của các nhóm thiol tự do được tính bằng công thức sau:

$$C_{thiol} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} (M)$$

b: độ dài quỹ đạo quang của cuvet (thường là 1 cm).

Số mol của các nhóm thiol tự do được tính từ nồng độ mol của các nhóm thiol tự do và thể tích của dung dịch protein toàn phần.

Thêm 1,1 lần số mol của nhóm thiol tự do của vc-MMAE (tức là MC-vc-PAB-MMAE) (được hòa tan trong DMSO) vào kháng thể khử, trộn ở nhiệt độ phòng và cho phản ứng trong 2 giờ, trộn ngắt quãng. Thêm N-acetylcysteine với lượng gấp 20 lần số mol của vc-MMAE (tức là MC-vc-PAB-MMAE) trong dung dịch phản ứng vào hệ phản ứng, trộn, và hỗn hợp được để yên trong 5 phút. Hỗn hợp được trao đổi đệm bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc 15 ml 30 KD thành dung dịch gốc liên hợp (20mM Histidin, 3% Sucroza, 0,03% Tween-80, pH 5,5) trong tổng cộng 3 lần. Sản phẩm thể liên hợp kháng thể-dược chất ADC kháng Claudin-18.2 thu được (thuật ngữ được sử dụng chung cho các thể liên hợp kháng thể-dược chất được điều chế từ kháng thể được làm tương thích với người 18D10 hoặc 18A9) được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

2. Xác định DAR của thể liên hợp kháng thể-dược chất

Tải trọng dược chất (tỷ lệ dược chất so với kháng thể, DAR) của thể liên hợp kháng thể-dược chất được xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC-HPLC).

Profin HIC của thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18D10-VH6/VL1-ADC điển hình được thể hiện trên Fig. 6. Theo diện tích đỉnh của profin, DAR trung bình là 3,8.

Tương tự, DAR trung bình của thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18D10-VH3/VL2-ADC là 3,5.

DAR trung bình của thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18D10-VH6/VL2-ADC là 3,4.

DAR trung bình của thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18A9-VH7/VL2-ADC là 3,0.

Cần lưu ý rằng tên của các thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trên, như

CM311-18D10-VH6/VL1-ADC, chỉ ra rằng kháng thể được dùng trong quy trình điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất là CM311-18D10-VH6/VL1. Ngoài ra, tên kháng thể CM311-18D10-VH6/VL1 chỉ ra rằng kháng thể được dùng trong quy trình điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trên là kháng thể trong lớp các kháng thể 18D10 có vùng biến đổi của chuỗi nặng là VHv6 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là VLv1; Như có thể thấy từ Bảng 2 nêu trên, kháng thể đặc hiệu được dùng trong quy trình điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trên là h18D10.v16. Tên của ba thể liên hợp kháng thể-dược chất còn lại CM311-18D10-VH3/VL2-ADC, CM311-18D10-VH6/VL2-ADC và CM311-18A9-VH7/VL2-ADC có thể được hiểu bằng cách tham khảo phần nêu trên. Cụ thể, kháng thể đặc hiệu được dùng trong quy trình điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18D10-VH3/VL2-ADC là h18D10.v23 trong Bảng 2; kháng thể đặc hiệu được dùng trong quy trình điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18D10-VH6/VL2-ADC là h18D10.v26 trong Bảng 2; kháng thể đặc hiệu được dùng trong quy trình điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311-18A9-VH7/VL2-ADC là h18A9.v27 trong Bảng 2.

Ví dụ 4. Nghiên cứu dược lực học *in vitro* của thể liên hợp kháng thể-dược chất

Sau 1-2 lần truyền của dòng tế bào phục hồi, đầu tiên chất nổi bề mặt được hút pipet vào ống ly tâm 15 mL, ly tâm, và loại bỏ chất nổi bề mặt thu được; rửa bình nuôi cấy tế bào bằng 5 mL PBS, và sau đó tiêu tế bào bằng 2 mL Trypsin-EDTA. Tế bào được tái tạo huyền phù bằng môi trường trong ống ly tâm 15 mL trước đó, và quay ly tâm; loại bỏ chất nổi bề mặt, các tế bào được tái tạo huyền phù với môi trường một lần nữa, và lấy 0,5 mL và đếm bằng máy đếm tế bào. Tế bào được đặt trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng (tế bào LT-1C8 ở mật độ 5000 hoặc 10000 tế bào/giếng, tế bào LT-M11 ở mật độ 5000 tế bào/giếng, và BxPC-3 ở mật độ 3000 tế bào/giếng); sau 24 giờ nuôi cấy, các nồng độ pha loãng tuần tự của thể liên hợp kháng thể-dược chất CM311 ADC (được liên hợp bằng các kháng thể đơn dòng CM311 khác nhau) được thêm vào và ủ trong 96 giờ, sau đó thuốc thử phát hiện CCK-8 hoặc Presto-Blue được thêm vào mỗi giếng, và sử dụng máy đọc vi đĩa để phát hiện và tiến hành khớp bốn thông số.

Thuốc thử và nguồn thử nghiệm:

Các mục

Thế liên hợp kháng thể-dược chất (tên)	Nồng độ	Điều kiện bảo quản
CM311-18D10-VH3/VL2-ADC	1,0 mg/mL	2-8°C
CM311-18D10-VH6/VL1-ADC	1,2 mg/mL	2-8°C
CM311-18D10-VH6/VL2-ADC	0,9 mg/mL	2-8°C
CM311-18A9-VH7/VL2-ADC	0,7 mg/mL	2-8°C

Dòng tế bào

Dòng tế bào	Kiểu tế bào	Mức biểu hiện Claudin 18.2	Nguồn	Môi trường nuôi cấy
LT-M11	Dòng tế bào ổn định KATO	Biểu hiện cao	KEYMED BIOSCIENCES CO LTD	IMDM + 20% FBS
LT-1C8	Dòng tế bào ổn định KATO	Biểu hiện trung bình	KEYMED BIOSCIENCES CO LTD.	IMDM + 20% FBS

Các kết quả thử nghiệm:

Giá trị IC_{50} trung bình của mỗi CM311 ADC được thể hiện trong Bảng 3. Fig. 7 là đồ thị mô tả tác dụng tiêu diệt tế bào trên các tế bào LT-M11 bằng các CM311 ADC khác nhau.

Bảng 3: Giá trị IC_{50} của các CM311 ADC ở các dòng tế bào được sàng lọc

Dòng tế bào	IC_{50} trung bình của CM311-18D10-VH3/VL2- ADC (ng/mL)	IC_{50} trung bình của CM311-18D10-VH6/VL1- ADC (ng/mL)	IC_{50} trung bình của CM311-18D10-VH6/VL2- ADC (ng/mL)	IC_{50} trung bình của CM311-18A9-VH7/VL2- ADC (ng/mL)
LT-1C8	520,5	253,9	615,1	111,1
LT-M11	200,3	113,8	349,6	155,5
	131,5	51,07	146,6	51,22
BxPC-3	5295	4632	4237	4045

Lưu ý: Trên Fig. 7:

Mẫu 1: CM311-18D10-VH3/VL2-ADC

Mẫu 2: CM311-18D10-VH6/VL1-ADC

Mẫu 3: CM311-18D10-VH6/VL2-ADC

Mẫu 4: CM311-18A9-VH7/VL2-ADC

Có thể thấy từ các kết quả trong Bảng 3 và Fig. 7 là các CM311 ADC khác nhau cho thấy hoạt tính tiêu diệt tế bào đáng kể ở các dòng tế bào biểu hiện Claudin 18.2 vừa và cao, nhưng không có hoạt tính tiêu diệt tế bào đáng kể ở dòng tế bào BxPC-3 âm tính với Claudin 18.2.

Ví dụ 5. Nghiên cứu dược lực học *in vivo* về các thể liên hợp kháng thể-dược chất

Hoạt tính kháng u của CM311ADC được thử nghiệm ở hai mô hình PDX ung thư dạ dày, STO#025 và STO#523. Cả hai mô hình ung thư dạ dày đều có nồng độ mARN Claudin 18 cao hơn.

Quy trình thiết lập mô hình PDX ung thư dạ dày của người ở chuột không lông như sau: mô khối u có thể tích khoảng 15-30 mm³ được cấy ghép dưới da vào lưng của chuột không lông BALB/c. Khi thể tích khối u đạt 150-260 mm³, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm, với 5 chuột mỗi nhóm, để đảm bảo rằng thể tích khối u đồng nhất giữa các nhóm khác nhau và thể trọng cũng được xem xét. Có tổng 4 nhóm, bao gồm nhóm chất dẫn, nhóm dùng 1 mg/kg CM311-ADC-1, nhóm dùng 3 mg/kg CM311-ADC-1 và nhóm dùng 3 mg/kg CM311-ADC-2 (ADC đối chứng, không liên kết). Trong số các nhóm này, CM311-ADC-1 là thể liên hợp kháng thể dược chất CM311-18D10-VH6/VL1-ADC; so với CM311-ADC-1, kháng thể CM311-ADC-2 là đối chứng isotyp IgG1 của người, không liên kết với đích trên bề mặt của các tế bào khối u.

Phân tích dữ liệu: Trong quá trình thử nghiệm, đo thể tích khối u hai lần một tuần. Công thức tính thể tích khối u (TV) là: $TV = l \times w^2 / 2$, trong đó l và w lần lượt là chiều dài và chiều rộng đo được của khối u. Thể tích khối u tương đối (RTV) được tính theo các kết quả đo, $RTV = V_f / V_0$, trong đó V_0 là thể tích khối u đo được tại thời gian dùng của nhóm (tức là, ngày 0), và V_f là thể tích khối u đo được vào ngày cuối. Tỷ lệ tăng sinh khối u tương đối T/C (%) = $(RTV \text{ ở nhóm sử dụng} / RTV \text{ ở nhóm chất dẫn}) \times 100\%$. Tỷ lệ ức chế sự sinh trưởng của khối u TGI% = $(\text{thể tích khối u trung bình của nhóm chất dẫn} - \text{thể tích khối u trung bình của nhóm sử dụng}) / \text{thể tích khối u trung bình của nhóm chất dẫn} \times 100\%$. Khi $T/C(\%) \leq 40\%$, và $P < 0,05$, ADC thử nghiệm được coi là có tác dụng ức chế đáng kể trên sự sinh trưởng của khối u.

Kết quả thử nghiệm:

1) Nghiên cứu hiệu lực của CM311ADC ở mô hình PDX ung thư dạ dày của người STO#025 có biểu hiện mARN Claudin 18 cao

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 8 và Fig. 9. Sau khi sử dụng CM311-ADC-1 với liều 1 và 3 mg/kg, tỷ lệ tăng sinh khối u tương đối T/C (%) vào ngày 28 lần lượt là 29,86% và 0%, và tỷ lệ ức chế sự sinh trưởng khối u TGI% lần lượt là 70,13% và 100%, với lần lượt 0/5 và 5/5 khối u bị thoái hóa hoàn toàn, và 2/5 và 0/5 khối u bị thoái hóa một phần; T/C (%) của nhóm CM311-ADC-2 (3 mg/kg) là 67,24%, và TGI % là 32,76%. Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng cả CM311-ADC-1 (3 mg/kg) và CM311-ADC-1 (1 mg/kg) có hoạt tính ức chế đáng kể trên sự sinh trưởng của khối u, trong khi CM311-ADC-2 (3 mg/kg) không có hoạt tính kháng u đáng kể. Chuột mang khối u có thể dung nạp CM311-ADC-1 và CM311-ADC-2 rất tốt.

2) Nghiên cứu hiệu lực của CM311ADC trong mô hình PDX ung thư dạ dày của người STO#523 có biểu hiện mARN Claudin 18 cao

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 10 và Fig. 11. Sau khi sử dụng CM311-ADC-1 ở liều 1 và 3 mg/kg, tỷ lệ tăng sinh khối u tương đối T/C (%) vào ngày 28 lần lượt là 35,60% và 6,79%, và tỷ lệ ức chế sự sinh trưởng khối u TGI% lần lượt là 64,40% và 93,21%; T/C (%) của nhóm CM311-ADC-2 (3 mg/kg) là 114,81%, và TGI% là -14,81%. Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng cả CM311-ADC-1 (3 mg/kg) và CM311-ADC-1 (1 mg/kg) đều có hoạt tính ức chế chống lại sự sinh trưởng của khối u đáng kể, trong khi CM311-ADC-2 (3 mg/kg) không có hoạt tính kháng u đáng kể. Chuột mang khối u có thể dung nạp CM311-ADC-1 và CM311-ADC-2 rất tốt.

Ví dụ 6. So sánh hoạt tính tế bào *in vitro* giữa kháng thể và thể liên hợp kháng thể-dược chất

Phương pháp thử nghiệm:

Dòng tế bào KATO III được đặt ở mật độ 5000 tế bào/giếng, và các mẫu được thử nghiệm được thêm vào 24 giờ sau đó. Tất cả mẫu được thử nghiệm được pha loãng 2,4 lần bắt đầu từ nồng độ cuối cùng là 1000 ng/mL trong 9 lần và ủ trong 96 giờ, và đọc cường độ huỳnh quang bằng máy đọc vi đĩa sau khi hiện màu trong 60 phút bằng PrestoBlue.

Các mẫu được thử nghiệm như sau:

Mẫu 1: CM311, cụ thể là CM311-18D10-VH6/VL1;

Mẫu 2: ADC kháng Claudin-18.2, cụ thể là CM311-18D10-VH6/VL1- ADC;

Mẫu 3: ADC đối chứng, không liên kết, cụ thể là IgG-L1D1 (IgG-L1D1 là ADC trong đó kháng thể IgG được liên hợp với phân tử nhỏ L1D1 (tức là vcMMAE, tức là, MC-vc-PAB-MMAE)).

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 12 và Bảng 4. Như có thể thấy từ Fig. 12, ADC kháng Claudin-18.2 (ví dụ CM311-18D10-VH6/VL1-ADC) cho thấy hiệu lực tiêu diệt tế bào mạnh với giá trị EC_{50} là 16,37 ng/mL; trong khi CM311 (ví dụ CM311-18D10 -VH6/VL1) và IgG-L1D1 không thể hiện hiệu lực tiêu diệt tế bào đáng kể.

Bảng 4: Các kết quả so sánh hoạt tính tế bào *in vitro* của kháng thể và thể liên hợp kháng thể-dược chất (kết quả khớp 4 tham số)

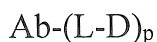
Hiệu chuẩn đường cong: 4 tham số

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^B}$$

	Tham số	Giá trị ước lượng	Sai số chuẩn	Khoảng tin cậy
CM311 $R^2 = 0,939$ $EC_{50} = 1,29e+13$	A	4,087	0,017	[4,046, 4,127]
	B	0,516	0,571	[-0,881, 1,913]
	C	1,29e+13	6,41e+18	[-1,57e+19, 1,57e+19]
	D	-2,42e+4	6,19e+9	[-1,51e+10, 1,51e+10]
ADC kháng Claudin 18.2 $R^2 = 0,997$ $EC_{50} = 16,37$	A	4,107	0,017	[4,066, 4,148]
	B	1,437	0,149	[1,073, 1,801]
	C	16,37	1,287	[13,22, 19,52]
	D	3,337	0,015	[3,299, 3,375]
IgG-L1D1 $R^2 = 0,980$ $EC_{50} = 9,04e+12$	A	4,098	0,013	[4,065, 4,130]
	B	0,555	0,330	[-0,253, 1,362]
	C	9,04e+12	4,62e+18	[-1,13e+19, 1,13e+19]
	D	-7,86e+4	2,23e+10	[-5,45e+10, 5,45e+10]

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể liên hợp kháng thể-dược chất, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó thể liên hợp kháng thể-dược chất này có cấu trúc được thể hiện trong công thức I:



Công thức I

trong đó Ab là kháng thể kháng Claudin 18.2 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó:

trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 42,

trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 43,

trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 44,

trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 50,

trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 51, và

trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 52;

D là MMAE;

L là MC-vc-PAB; và

p là từ 2,0 đến 8,0.

2. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 1, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 41 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 49.

3. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 2, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này,

trong đó chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 65 và chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 66.

4. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó p là từ 2,0 đến 7,0, 2,0 đến 6,0, 2,0 đến 5,0, 2,0 đến 4,0, 3,0 đến 7,0, 3,0 đến 6,0, 3,0 đến 5,0 hoặc 3,0 đến 4,0.

5. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 4, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó p là từ 3,0 đến 4,0.

6. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 5, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó p là từ 3,0 đến 3,8.

7. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 6, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó p là 3,0, 3,4, 3,5 hoặc 3,8.

8. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 7, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó p là 3,8.

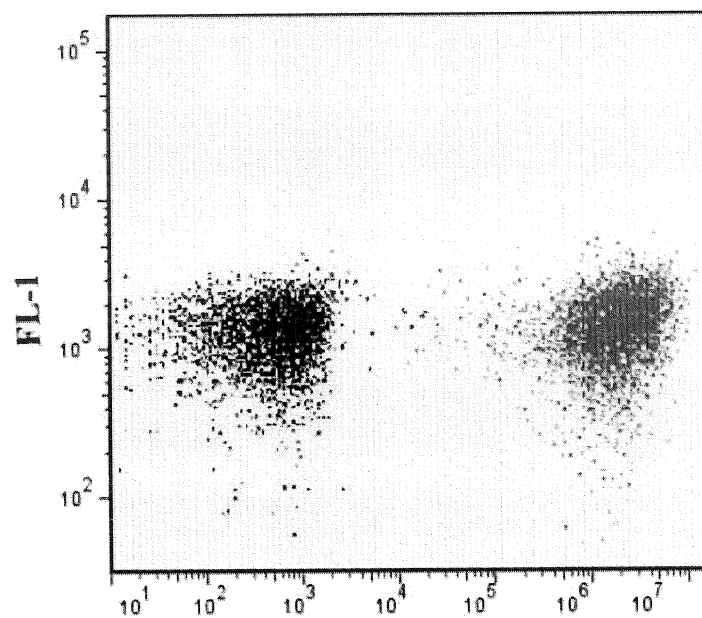
9. Chế phẩm chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, muối, solvat được dụng hoặc solvat của muối nêu trên của thể liên hợp kháng thể-dược chất này.

10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một trong số dược chất hóa trị liệu, dược chất miễn dịch trị liệu hoặc chất ức chế miễn dịch đã biết trong việc điều trị khối u; và/hoặc

ít nhất là một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.



Fig. 1



Biểu hiện của Claudin 18.2

■ Dòng tế bào HEK293

■ Tế bào được chuyển nhiễm ổn định HEK293 biểu hiện Claudin 18.2 của người

Fig. 2

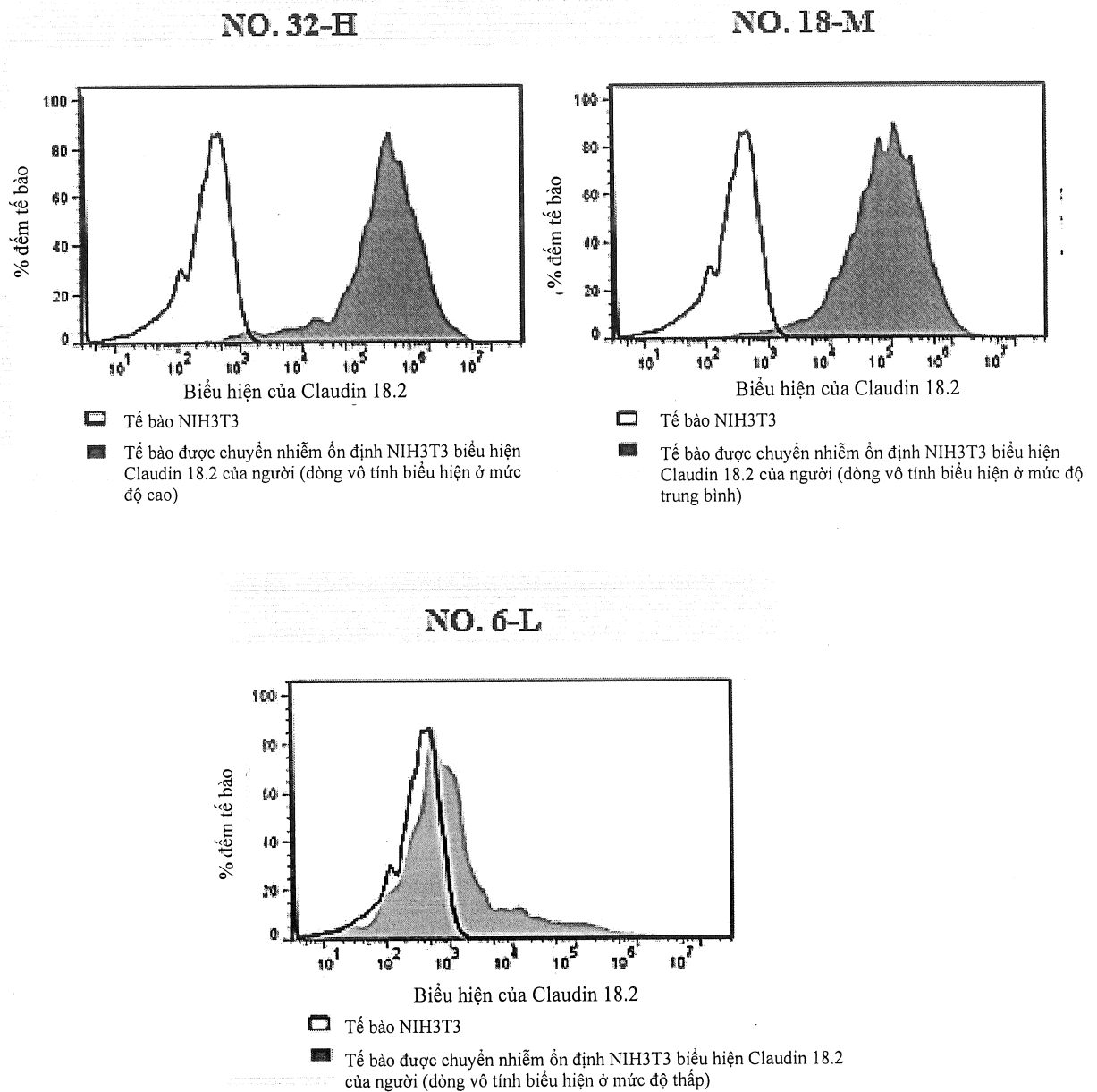


Fig. 3

ADCC

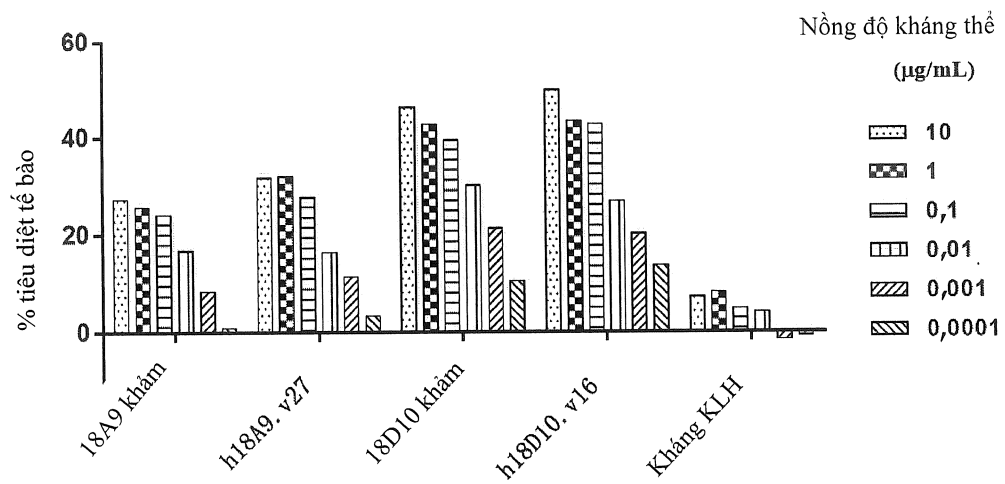


Fig. 4

CDC

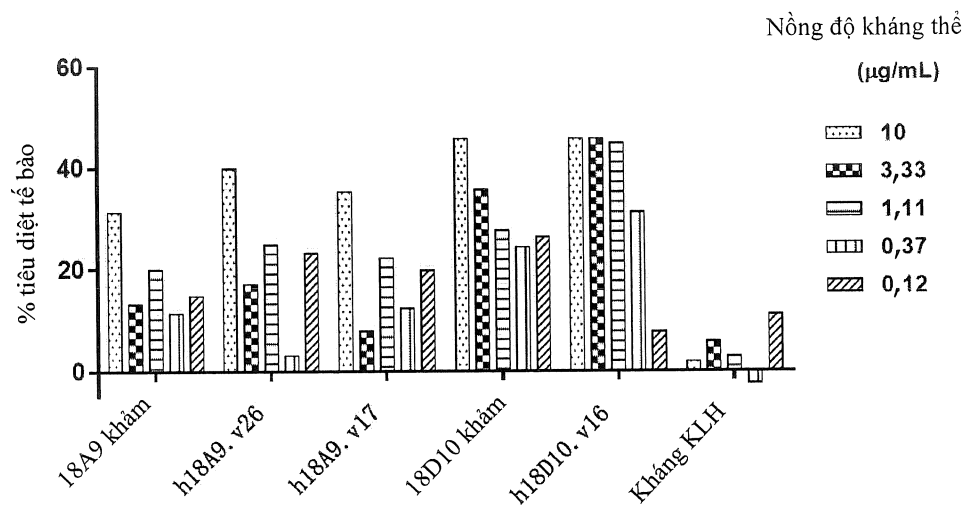


Fig. 5

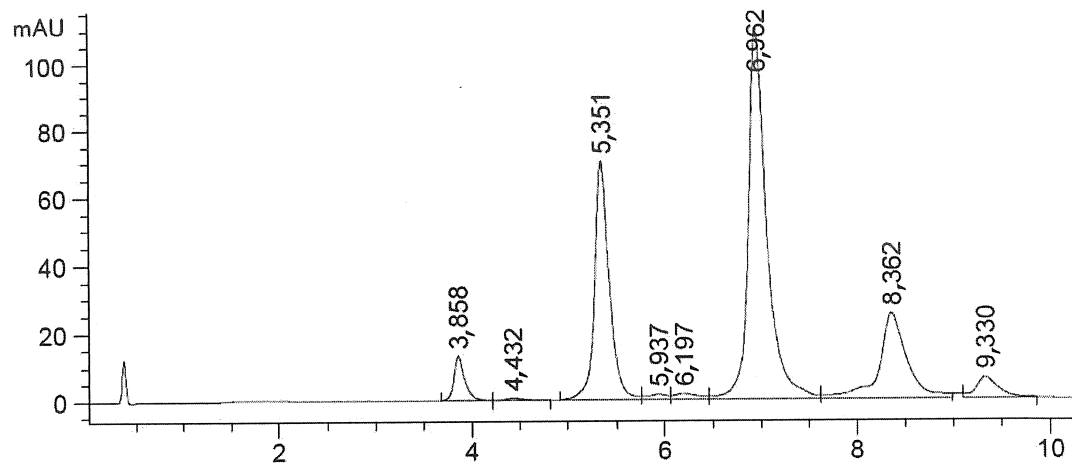
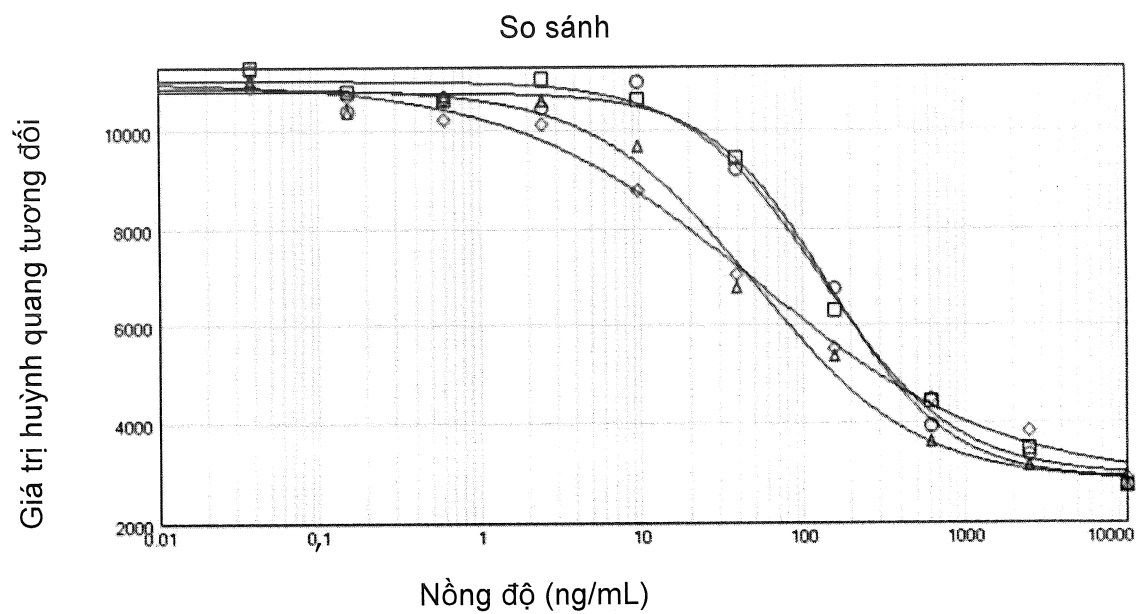


Fig. 6



- Mẫu 1
- △ Mẫu 2
- Mẫu 3
- ◇ Mẫu 4

Fig. 7

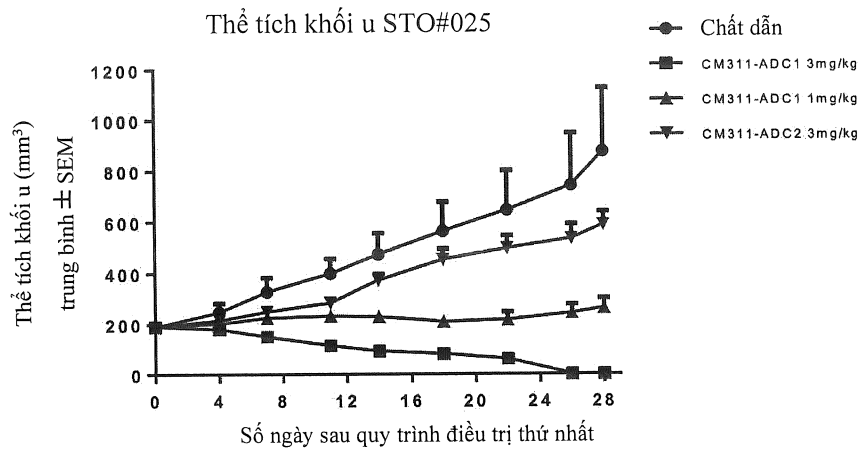


Fig. 8

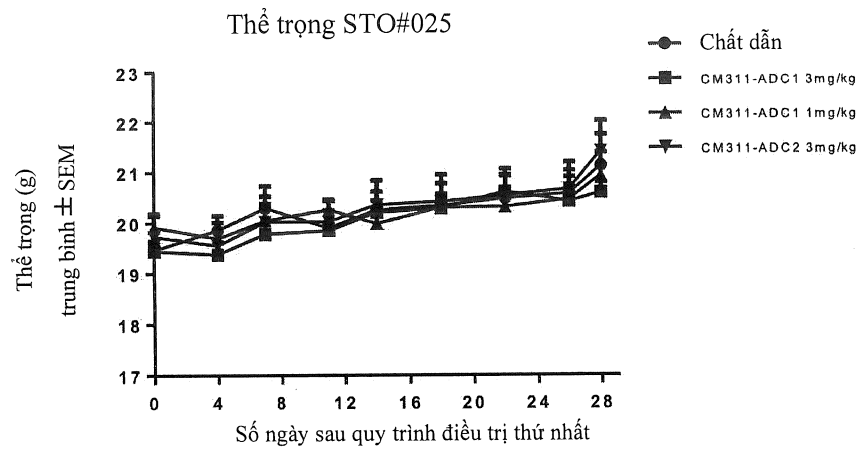


Fig. 9

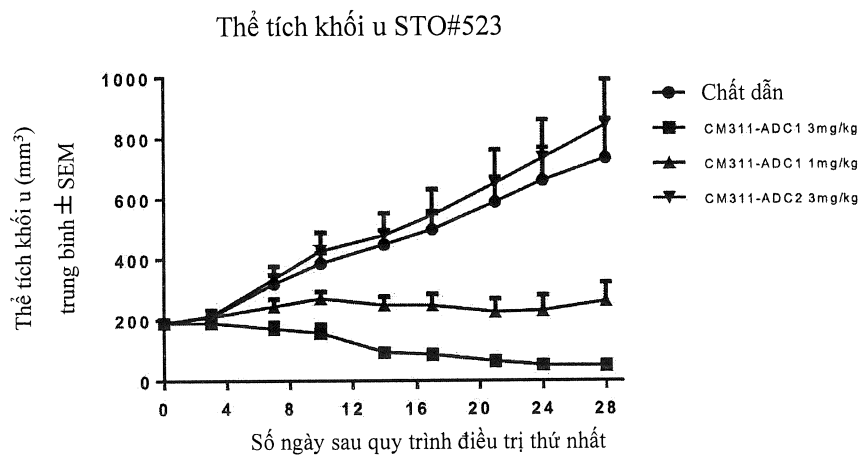


Fig. 10

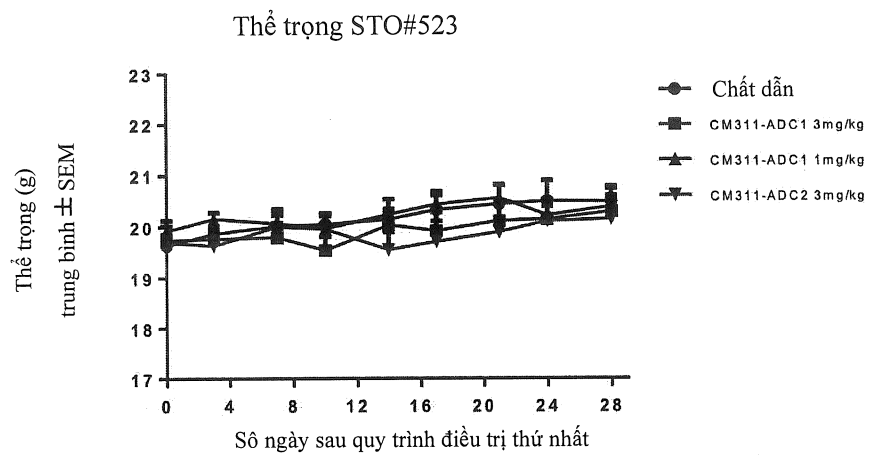


Fig. 11

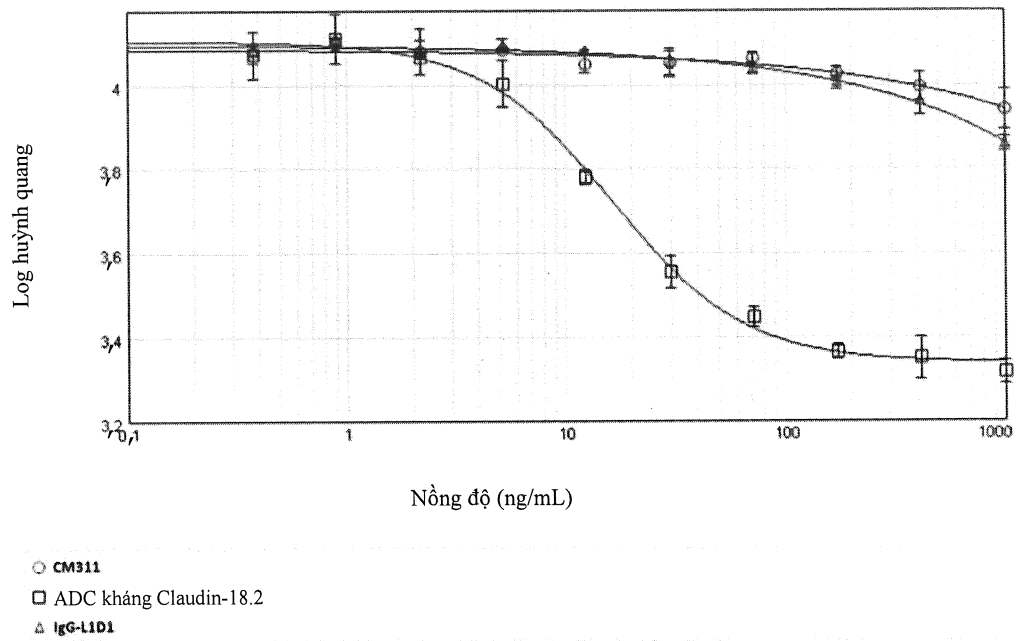


Fig. 12

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SHANGHAI MIRACOGEN INC.
 KEYMED BIOSCIENCES CO.,LTD

<120> THỂ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ DƯỢC CHẤT VÀ CHẾ PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY

<130> IEC210347PCT

<150> CN202011105383.0
 <151> 2020-10-15

<160> 200

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv1

<400> 1

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18D10VHv1 CDR1

<400> 2

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18D10VHv1 CDR2

<400> 3

Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18D10VHv1 CDR3

<400> 4

Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr
1 5

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv1 FR1

<400> 5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv1 FR2

<400> 6

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv1 FR3

<400> 7

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25 30

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv1 FR4

<400> 8

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

<210> 9
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18D10VHv2

<400> 9

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv2 CDR1

<400> 10

Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Trp	Asn
1				5					10	

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv2 CDR2

<400> 11

Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv2 CDR3

<400> 12

Ser	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Phe	Ile	Tyr
1				5				

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv2 FR1

<400> 13

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
			20					25

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv2 FR2

<400> 14

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv2 FR3

<400> 15

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

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv2 FR4

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv3

<400> 17

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18D10VHv3 CDR1

<400> 18

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 19
<211> 16
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv3 CDR2

<400> 19

Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv3 CDR3

<400> 20

Ser	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Phe	Ile	Tyr
1				5				

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv3 FR1

<400> 21

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
			20					25

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv3 FR2

<400> 22

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv3 FR3

<400> 23

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv3 FR4

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4

<400> 25

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4 CDR1

<400> 26

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4 CDR2

<400> 27

Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4 CDR3

<400> 28

Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr
 1 5

<210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4 FR1

<400> 29

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4 FR2

<400> 30

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 31
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4 FR3

<400> 31

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv4 FR4

<400> 32

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

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv5

<400> 33

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 CDR1

<400> 34

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 CDR2

<400> 35

Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 CDR3

<400> 36

Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr

1

5

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 FR1

<400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 FR2

<400> 38

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 39
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 FR3

<400> 39

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5 FR4

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv6

<400> 41

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv6 CDR1

<400> 42

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv6 CDR2

<400> 43

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv6 CDR3

<400> 44

Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr
 1 5

<210> 45
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv6 FR1

<400> 45

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv6 FR2

<400> 46

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv6 FR3

<400> 47

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VHv6 FR4

<400> 48

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 17

1

5

10

<210> 49
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv1

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv1 CDR1

<400> 50

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv1 CDR2

<400> 51

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv1 CDR3

<400> 52

Gln Asn Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 53

<211> 23

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv1 FR1

<400> 53

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv1 FR2

<400> 54

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

<210> 55
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv1 FR3

<400> 55

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

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

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv1 FR4

<400> 56

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10

<210> 57
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

20

<220>

<223> 18D10VLv2

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv2 CDR1

<400> 58

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv2 CDR2

<400> 59

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv2 CDR3

<400> 60

Gln Gln Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv2 FR1

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv2 FR2

<400> 62

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

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv2 FR3

<400> 63

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

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

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18D10VLv2 FR4

<400> 64

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 65

<211> 448

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng

<400> 65

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 66
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 67
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv1

<400> 67

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 27

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv1 CDR1

<400> 68

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
1 5 10

<210> 69
<211> 16
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv1 CDR2

<400> 69

Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv1 CDR3

<400> 70

Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser
1 5

<210> 71
<211> 25
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv1 FR1

<400> 71

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
 20 25

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv1 FR2

<400> 72

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

<210> 73

<211> 33

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv1 FR3

<400> 73

Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15

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

Arg

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv1 FR4

<400> 74

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

<210> 75

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv2

<400> 75

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv2 CDR1

<400> 76

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Asp
1				5					10

<210> 77
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv2 CDR2

<400> 77

Gly	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

<210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv2 CDR3

<400> 78

Arg	Val	Arg	Gly	Asn	Ser	Phe	Asp	Ser
1				5				

<210> 79
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv2 FR1

<400> 79

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
20 25

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv2 FR2

<400> 80

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

<210> 81
<211> 33
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv2 FR3

<400> 81

Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

Arg

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv2 FR4

<400> 82

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

<210> 83
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv3

<400> 83

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv3 CDR1

<400> 84

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
1 5 10

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv3 CDR2

<400> 85

Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv3 CDR3

<400> 86

Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser
1 5

<210> 87

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv3 FR1

<400> 87

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
20 25

<210> 88
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv3 FR2

<400> 88

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

<210> 89
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv3 FR3

<400> 89

Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15

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

Arg

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv3 FR4

<400> 90

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

<210> 91
 <211> 118
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv4

<400> 91

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

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

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv4 CDR1

<400> 92

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
1 5 10

<210> 93
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv4 CDR2

<400> 93

Gly	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv4 CDR3

<400> 94

Arg	Val	Arg	Gly	Asn	Ser	Phe	Asp	Ser
1				5				

<210> 95
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv4 FR1

<400> 95

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
			20					25

<210> 96
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv4 FR2

<400> 96

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

<210> 97

<211> 33

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv4 FR3

<400> 97

Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

Arg

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv4 FR4

<400> 98

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

<210> 99

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv5

<400> 99

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv5 CDR1

<400> 100

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
 1 5 10

<210> 101
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv5 CDR2

<400> 101

Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv5 CDR3

<400> 102

Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser
1 5

<210> 103

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv5 FR1

<400> 103

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
20 25

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv5 FR2

<400> 104

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

<210> 105
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv5 FR3

<400> 105

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15

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

Arg

<210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv5 FR4

<400> 106

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

<210> 107
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6

<400> 107

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6 CDR1

<400> 108

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
 1 5 10

<210> 109
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6 CDR2

<400> 109

Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
 1 5 10 15

<210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6 CDR3

<400> 110

Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser
 1 5

<210> 111
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6 FR1

<400> 111

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
 20 25

<210> 112
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6 FR2

<400> 112

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

<210> 113
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv6 FR3

<400> 113

Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15

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

Arg

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv6 FR4

<400> 114

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

<210> 115

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv7

<400> 115

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv7 CDR1

<400> 116

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
1 5 10

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv7 CDR2

<400> 117

Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VHv7 CDR3

<400> 118

Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser
1 5

<210> 119

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv7 FR1

<400> 119

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
20 25

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv7 FR2

<400> 120

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

<210> 121

<211> 33

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv7 FR3

<400> 121

Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met
1 5 10 15

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

Arg

<210> 122
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv7 FR4

<400> 122

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

<210> 123
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv1

<400> 123

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 47

85

90

95

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv1 CDR1

<400> 124

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv1 CDR2

<400> 125

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv1 CDR3

<400> 126

Gln Asn Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 127
<211> 23
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VLv1 FR1

<400> 127

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 128
<211> 15
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VLv1 FR2

<400> 128

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

<210> 129
<211> 32
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18A9VLv1 FR3

<400> 129

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

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

<210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv1 FR4

<400> 130

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 131
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv2

<400> 131

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv2 CDR1

<400> 132

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv2 CDR2

<400> 133

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 134
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv2 CDR3

<400> 134

Gln Gln Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 23
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VLv2 FR1

<400> 135

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys
			20			

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VLv2 FR2

<400> 136

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

<210> 137

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VLv2 FR3

<400> 137

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

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

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VLv2 FR4

<400> 138

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 139

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 139

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR1 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 140

Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Trp	Asn
1				5					10	

<210> 141

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR2 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 141

Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR3 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 142

Ser	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Phe	Ile	Tyr
1				5				

<210> 143

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR1 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 143

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr
20 25

<210> 144
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> FR2 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 144

Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 145
<211> 32
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> FR3 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 145

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

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

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> FR4 chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 146

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

<210> 147
<211> 113
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 147

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 148

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR1 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 148

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 149
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 149

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR3 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 150

Gln Asn Ala Tyr Ser Phe Pro Trp Thr
 1 5

<210> 151
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> FR1 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 151

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
 20

<210> 152
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR2 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 152

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

<210> 153

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR3 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 153

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

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

<210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR4 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 154

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

<210> 155

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 155

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ile Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Met Thr Ala Asn
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 156
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 156

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Asp
 1 5 10

<210> 157
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 157

Gly Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asp Thr Val Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR3 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 158

Arg Val Arg Gly Asn Ser Phe Asp Ser
1 5

<210> 159

<211> 25

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR1 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 159

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser
20 25

<210> 160

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR2 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 160

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

<210> 161
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> FR3 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 161

Ala	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Met	Thr	Ala	Asn	Met
1				5					10					15	

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

Arg

<210> 162
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> FR4 chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 162

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

<210> 163
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 163

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

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 164
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 164

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 165
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 165

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR3 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 166

Gln Asn Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 167
<211> 23
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> FR1 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 167

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
20

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> FR2 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 168

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

<210> 169
<211> 32
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR3 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 169

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

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

<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> FR4 chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 170

Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
1				5					10

<210> 171

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi ngược dòng

<400> 171

ttggcaaaga attgctagat gtccaccacc acatgcc

37

<210> 172

<211> 38

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi xuôi dòng

<400> 172

tggtcgggcc ctcctcgatt acacatagtc gtgcttgg

38

<210> 173
<211> 37
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi ngược dòng

<400> 173
ttggcaaaga attgctagat ggccgtgact gcctgtc 37

<210> 174
<211> 38
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi xuôi dòng

<400> 174
tgttcgggcc ctccctcgatt acacatagtc gtgcttgg 38

<210> 175
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi KNB14

<400> 175
tgtgcgccac catggccgtg 20

<210> 176
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi KNB15

<400> 176
tggaaggata agattgtacc 20

<210> 177
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi KNB16

<400> 177

tgggtgccat tggcctcctg

20

<210> 178

<211> 354

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng dòng vô tính 18D10

<400> 178

gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tctactggcta ctcaatcacc agtaattatg cctggaactg gatccgacag 120

tttccaggaa acaaactaga gtggatgggc tacataaact acagtgggaa cactaactat 180

aaccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240

ctgcagttga attctgtgac tgctgaggac acagccacat attattgtgc aacctcctat 300

tatggtaatt cttttattta ctggggccaa gggactctgg tctactgtctc tgca 354

<210> 179

<211> 339

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ dòng vô tính 18D10

<400> 179

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gagtctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatgc ttatagtttt 300

ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaa 339

<210> 180

<211> 354

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng dòng vô tính 18A9

<400> 180
caggtgcagc tgcagcagtc tggacgtgag gtggttaaggc ctgggacttc agtgaagggtg 60
tcctgcaagc cttctggata cgccttcact aattacttga tagactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gccttgagt gattggaggg attaatcctg gaagtgggtga cactgtgtac 180
aatgagaagt tcaaggccaa ggcaacactg actgcagaca aatcctccat gactgccaac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgatgac tctgcggtct atttctgcgc aagaagggtc 300
cgtggttaatt cgtttgattc ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 181
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ dòng vô tính 18A9

<400> 181
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctact 60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaattgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaaagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca ctttattact gtcagaataa ttatTTTTAT 300
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 182
<211> 354
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> 18D10VHv1

<400> 182
caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60

acctgtaccg tgtccggcta cagcatcacc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatcggc tacatcaact acagcggcaa caccaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 183
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv2

<400> 183
 caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60
 acctgtaccg tgtccggcgg cagcatcagc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatgggc tacatcaact acagcggcaa caccaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag aatcaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 184
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv3

<400> 184
 caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60
 acctgtaccg tgtccggcgg cagcatcagc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatcggc tacatcaact acagcggcaa caccaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 185
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv4

<400> 185
 caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60
 acctgtaccg tgtccggcgg cagcatcagc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatcggc tacatcaact acagcggcta caccaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 186
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv5

<400> 186
 caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60
 acctgtaccg tgtccggcgg cagcatcagc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatcggc tacatcaact acagcggcaa caccgcctac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 187
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VHv6

<400> 187
 caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60
 acctgtaccg tgtccggcgg cagcatcagc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatcggc tacatctact acagcggcaa caccaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 188
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv1

<400> 188
 gacatcgtga tgacacagag ccctgatagc ctggccgtgt ctctgggaga gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctgacc 120
 tggatatcagc agaagcccgg ccagcctcct aagctgctga tctactgggc cagcaccaga 180
 gaaagcggcg tgccagatag attcagcggc agcggctctg gaaccgactt caccctgaca 240
 atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gtcagaacgc ctacagcttc 300
 ccctggacat tcggccaggg caccaaggtg gaaatcaag 339

<210> 189
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18D10VLv2

<400> 189
 gacatcgtga tgacacagag ccctgatagc ctggccgtgt ctctgggaga gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctggcc 120
 tggatatcagc agaagcccgg ccagcctcct aagctgctga tctactgggc cagcaccaga 180
 gaaagcggcg tgccagatag attcagcggc agcggctctg gaaccgactt caccctgaca 240

atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gtcagcaggc ctacagcttc 300
 ccctggacat tcggccaggg caccaagggtg gaaatcaag 339

<210> 190
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng

<400> 190
 caggttcagc tgcaagagtc tggacctggc ctggtcaagc ctagcgagac actgagcctg 60
 acctgtaccg tgtccggcgg cagcatcagc agcaactacg cctggaactg gatcagacag 120
 cctcctggca aaggcctcga gtggatcggc tacatctact acagcggcaa caccaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agcagagaca ccagcaagaa ccagttcttc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgtgc cacaagctac 300
 tacggcaaca gcttcatcta ctggggccag ggcacactgg tcaccgtttc ttctgctagc 360
 accaagggcc catccgtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gcccaaattc 660
 tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720
 gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct ctttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
 tccctctccc tgtctccggg taaatga 1347

<210> 191
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin chuỗi nhẹ

<400> 191
 gacatcgtga tgacacagag ccctgatagc ctggccgtgt ctctgggaga gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctgacc 120
 tggatatcagc agaagcccgg ccagcctcct aagctgctga tctactgggc cagcaccaga 180
 gaaagcggcg tgccagatag attcagcggc agcggctctg gaaccgactt caccctgaca 240
 atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gtcagaacgc ctacagcttc 300
 ccctggacat tcggccaggg caccaaggtg gaaatcaagc gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
 tag 663

<210> 192
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHV1

<400> 192
 caggttcagc tgggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaagggtg 60

tcctgcaagc cttctggcta cgccttcacc aactacctga tcgactgggt ccgacaggct 120
 cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac 180
 aacgagaagt tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcat gaccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaagagt 300
 cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 193
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv2

<400> 193
 caggttcagc tgggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaagggt 60
 tcctgcaagc cttctggcta caccttcacc aactacctga tcgactgggt ccgacaggct 120
 cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac 180
 aacgagaagt tccagggcag agtgaccctg accgccgacg agtctaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaagagt 300
 cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 194
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv3

<400> 194
 caggttcagc tgggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaagggt 60
 tcctgcaagc cttctggcta caccttcacc aactacctga tcgactgggt ccgacaggct 120
 cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac 180
 aacgagaagt tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcat gaccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt actactgtgc cagaagagt 300

cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 195
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv4

<400> 195
 caggttcagc tgggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc aactacctga tcgactgggt cgcacaggct 120
 cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac 180
 aacgagaagt tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcat gaccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaagagtg 300
 cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 196
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VHv5

<400> 196
 caggttcagc tgggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagc cttctggcta caccttcacc aactacctga tcgactgggt cgcacaggct 120
 cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac 180
 aacgagaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtctaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaagagtg 300
 cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct 354

<210> 197
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv6

<400> 197

caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg	60
tcctgcaagc cttctggcta cgccttcacc aactacctga tcgactgggt cgcacaggct	120
cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac	180
aacgagaagt tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcag caccgcctac	240
atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaagagtg	300
cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct	354

<210> 198

<211> 354

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VHv7

<400> 198

caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg	60
tcctgcaagc cttctggcta caccttcacc aactacctga tcgactgggt cgcacaggct	120
cctggacagg gacttgaatg gatgggcggc atcaaccctg gcagcggcga tacagtgtac	180
aacgagaagt tccagggcag agtgaccctg accgccgaca cctctaccag caccgtctac	240
atggaactga gcagcctgag aagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaagagtg	300
cggggcaaca gcttcgattc ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtttc ttct	354

<210> 199

<211> 339

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 18A9VLv1

<400> 199

gacatcgtga tgacacagag ccctgatagc ctggccgtgt ctctgggaga gagagccacc	60
atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctgacc	120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcctcct aagctgctga tctactgggc cagcaccaga	180

gaaagcggcg tgccagatag attcagcggc agcggctctg gaaaggactt caccctgaca 240
 atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gccagaacaa ctacttctac 300
 cctctgacct tcggcggagg caccaaggtg gaaatcaag 339

<210> 200
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> 18A9VLv2

<400> 200
 gacatcgtga tgacacagag ccctgatagc ctggccgtgt ctctgggaga gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca ggcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctggcc 120
 tggatatcagc agaagcccgg ccagcctcct aagctgctga tctactgggc cagcaccaga 180
 gaaagcggcg tgccagatag attcagcggc agcggctctg gaaccgactt caccctgaca 240
 atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gccagcagaa ctacttctac 300
 cctctgacct tcggcggagg caccaaggtg gaaatcaag 339

72

1