



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

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

(11)



1-0051426

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/00; A61K 39/395; A61K 45/06; G01N 33/574; A61P 35/00; G01N 33/50; A61K 38/16; A61K 47/68 (13) B

(21) 1-2018-02014

(22) 12/10/2016

(86) PCT/KR2016/011428 12/10/2016

(87) WO2017/065493 20/04/2017

(30) 62/240,276 12/10/2015 US; 2016901555 28/04/2016 AU

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/09/2018 366A

(73) APROGEN INC. (Corporation Registration Number: 110111-0122731) (KR)

B1F, 545, Dunchon-daero, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13215 Republic of Korea

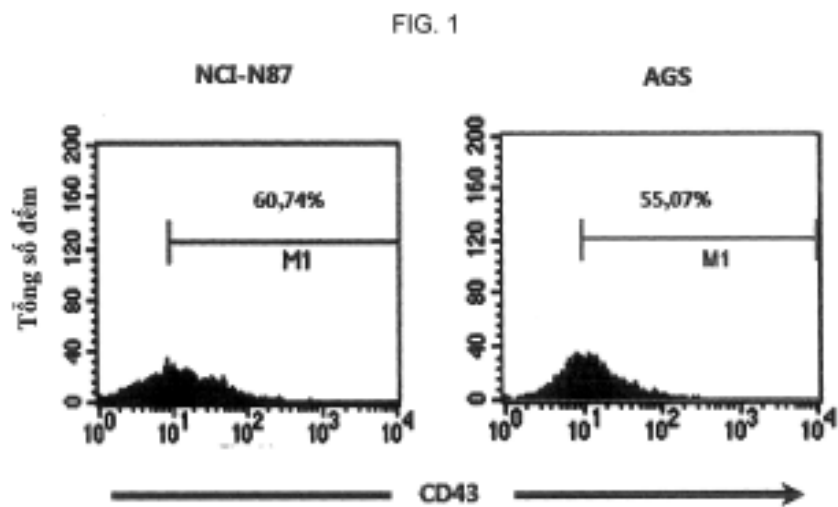
(72) HONG, Kwon Pyo (KR); YOON, Sangsoon (KR); KOUKOULAS, Irene (AU); BATORI, Vincent (DE); CRISTIANO, Briony (US); WILSON JR, David S (US); KOPSIDAS, George (AU).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD43 HOẶC MẢNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ, THỂ TIẾP HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(21) 1-2018-02014

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể để điều trị bệnh ung thư, cụ thể hơn, kháng thể kháng CD43 liên kết với miền ngoại bào của CD43, được phẩm điều trị bệnh ung thư hoặc ức chế tế bào gốc ung thư chứa kháng thể làm hoạt chất, và các phương pháp sàng lọc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể nêu trên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với miền ngoại bào của CD43, được phẩm điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm hoạt chất, được phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư chứa kháng thể kháng CD43 liên kết với miền ngoại bào của CD43 làm hoạt chất, và phương pháp sàng lọc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD43 là protein bề mặt tế bào được biểu hiện ở các nguyên bào máu khác nhau loại trừ hồng cầu. CD43 ở người, được biết dưới dạng sialophorin hoặc leukosialin, gồm có miền ngoại bào giống mucin gồm 235 axit amin, miền xuyên màng gồm 23 axit amin, và miền nội bào gồm 123 axit amin, và thông tin di truyền có liên quan được mã hóa trong một exon. Có nhiều axit amin serin (46 gốc) và threonin (47 gốc) trong miền CD43 ngoại bào ở người, và hầu hết chúng mang glycan được liên kết với O (O-glycan). Ngoài ra, N-glycan cũng được liên kết với CD43. Cấu trúc của O-glycan được biết là thay đổi lớn phụ thuộc vào loại tế bào. CD43 có một intron gồm 378 cặp bazơ, mà tách exon thành hai, và toàn bộ thông tin về vật liệu phiên mã được mã hóa trong exon thứ hai.

CD43 được tổng hợp dưới dạng tiền chất có kích thước khoảng 40 kDa bao gồm N-glycan, và được biến đổi thành vật liệu có kích thước từ 115 kDa đến 200 kDa thông qua các quy trình glycosyl hóa trưởng thành liên tục. Quy trình glycosyl hóa được kiểm soát nghiêm ngặt sau khi phiên mã tạo thành các protein dạng đồng phân có trọng lượng phân tử đặc trưng phụ thuộc vào loại và các protein này có thể được biểu hiện khác nhau phụ thuộc vào loại tế bào.

Epitop được glycosyl hóa của CD43 đã được biết dưới dạng chỉ thị riêng được giới hạn ở các tế bào máu trắng (bạch cầu), và tính hữu dụng cụ thể của nó làm

chỉ thị đối với bệnh máu ác tính được phát hiện. Với lý do này, trong nhiều nghiên cứu, khả năng sử dụng các kháng thể liên kết với epitop được glycosyl hóa của CD43 nhằm mục đích chẩn đoán hoặc điều trị bệnh được khảo sát. Kháng thể đơn dòng loài gặm nhấm nhận diện CD43 đã được biết là kích thích cơ chế gây chết tế bào theo chương trình ở dòng tế bào tiền thân tạo máu tủy xương âm tính với chỉ thị mà biểu hiện quá mức CD34 (Bazil *et al.* (1996) *Blood*, 87(4):1272-81) và các nguyên bào lympho T ở người (Brown *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:27686-95). Tuy nhiên, các kháng thể này không hiệu quả để phát hiện hoặc điều trị các tế bào ung thư, do hầu hết chúng phản ứng với epitop được glycosyl hóa được định vị trong miền ngoại bào của CD43 được biểu hiện trong các tế bào tạo máu trưởng thành (không bị ung thư). Do đó, cần phát triển vật liệu được cải thiện hơn liên kết với epitop được glycosyl hóa của CD43 để chẩn đoán, theo dõi và điều trị bệnh máu ác tính.

Mặt khác, giả thuyết về tế bào gốc ung thư, đề xuất tế bào gốc khác thường liên quan đến sự xuất hiện và tái phát của bệnh ung thư trong mô hình thứ bậc, đã được biết.

Tất cả các mô của cơ thể người được bắt nguồn từ tế bào gốc đặc trưng cơ quan. Tế bào gốc đặc trưng cơ quan có khả năng tự phục hồi (tự tái sinh) và biệt hóa thành tất cả các tế bào tạo nên mỗi cơ quan. Các tế bào gốc đặc trưng cơ quan này được phân biệt với tế bào gốc phôi ở chỗ chúng chỉ có thể được biệt hóa thành các loại tế bào trong cơ quan riêng biệt.

Giả thuyết tế bào gốc ung thư chủ yếu gồm có hai thành phần. Thứ nhất, khối u xuất hiện trong tế bào gốc trong mô, và thứ hai, khối u xuất hiện từ tế bào gốc có đặc tính cơ bản của tế bào gốc.

Tế bào gốc ung thư là tế bào ung thư có khả năng tái sinh vô hạn, được xác định là tế bào mà có thể tạo ra hiệu quả khối u khi được tiêm vào chuột nhắt bị ức chế miễn dịch, và biểu hiện tính không đồng nhất duy nhất của nó mà khối u tiên phát mang trong khối u được tạo ra.

Giả thuyết tế bào gốc ung thư trở nên cụ thể hóa hơn dưới dạng sinh học về tế bào gốc đã được phát triển gần đây. Giả thuyết tế bào gốc ung thư tạo ra bước tiến

bộ bằng báo cáo rằng bệnh bạch cầu ở người được tái lập ở chuột nhắt được ức chế miễn dịch được ghép các tế bào gốc ung thư có thể có từ bệnh nhân bị bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính vào năm 1997 (Bonnet D, Dick JE; Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997; 3: 730-7).

Tính không đồng nhất khác nhau mà khối u ác tính thể hiện tương ứng với khả năng biệt hóa khác nhau của tế bào gốc, và tính kháng thuốc xuất hiện lặp lại của tế bào ung thư, mặc dù nhiều phương pháp điều trị đích cũng tương ứng với tính chất cơ bản của tế bào gốc. Do tế bào gốc ung thư có thể tạo ra khối u mới bằng các tế bào tự tái sinh, dù là các tế bào khối u khác với tế bào gốc ung thư được loại bỏ hoàn toàn bằng phẫu thuật và hóa trị, nếu tế bào gốc ung thư được giữ lại thì bệnh ung thư sẽ tái phát.

Do đó, để chữa khỏi hoàn toàn bệnh ung thư, cần phải phát triển kỹ thuật để ức chế hoặc loại bỏ tế bào gốc ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh ung thư thể rắn chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư thể rắn, bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 cho đối tượng cần điều trị bệnh ung thư thể rắn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng để điều trị bệnh ung thư thể rắn của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Epitop có thể là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa kháng thể kháng CD43 được đề cập ở trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Dược phẩm, phương pháp và cách sử dụng để điều trị bệnh ung thư thể rắn có thể được đặc trưng, ví dụ, bởi có tác dụng ức chế đối với tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn. Theo một phương án, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày và bệnh máu ác tính có thể là bệnh bạch cầu.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu dược phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 cho đối tượng cần điều trị bệnh máu ác tính của bệnh ung thư thể rắn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Epitop có thể là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể chứa kháng thể kháng CD43 được đề cập ở trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một phương án, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp giữa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn. Một phương án đề xuất phương pháp tạo ra thể liên hợp giữa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung

thư thể rắn, trong đó phương pháp này có thể bao gồm bước dùng kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 vào mẫu bệnh ung thư, ví dụ, mẫu bệnh ung thư thể rắn hoặc bệnh nhân bị bệnh ung thư như bệnh nhân bị bệnh ung thư thể rắn. Thể liên hợp hoặc phương pháp tạo ra thể liên hợp này có thể được sử dụng cho các mục đích lâm sàng, chẩn đoán, và/hoặc thử nghiệm cũng như việc điều trị ung thư.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tác nhân để sàng lọc tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn chứa epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Một phương án đề xuất phương pháp sàng lọc tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn sử dụng epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Một phương án đề xuất cách sử dụng để sàng lọc tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn của epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Epitop có thể là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131. Tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn được sàng lọc như được mô tả ở trên có thể được đặc trưng bởi có tác dụng ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn. Theo một phương án, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tác nhân để sàng lọc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Một phương án đề xuất phương pháp sàng lọc tác nhân để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, sử dụng epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Một phương án đề xuất sử dụng để sàng lọc tác nhân để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, của epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Epitop có thể là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131. Theo một phương án, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD43 mới hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên

kết kháng nguyên của nó có thể liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Epitop có thể là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL).

Vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) thứ nhất (CDR1H), CDR thứ hai (CDR2H) và CDR thứ ba (CDR3H), theo thứ tự từ đầu cuối N đến đầu cuối C.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là thành phần thiết yếu của vùng biến đổi chuỗi nặng, và có thể bao gồm CDR1H bao gồm trình tự axit amin GYX₁MN (SEQ ID NO: 110; X₁ có thể được chọn từ tất cả các axit amin, và ví dụ, có thể là F hoặc Y) (ví dụ, GYFMN (SEQ ID NO: 111) hoặc GYYMN (SEQ ID NO: 112)), CDR2H bao gồm trình tự axit amin RINPNX₂GDSFYNQKFX₃G (SEQ ID NO: 113; X₂ và X₃ có thể được chọn từ tất cả các axit amin một cách tương ứng, và ví dụ, X₂ có thể là N hoặc S, và X₃ có thể là Q hoặc K) (ví dụ, RINPNNGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 114), RINPNSGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 115), RINPNNGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 116), hoặc RINPNSGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 117)), và CDR3H bao gồm trình tự axit amin EGYYGGRGYALDY (SEQ ID NO: 118).

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể bao gồm CDR thứ nhất (CDR1L), CDR thứ hai (CDR2L) và CDR thứ ba (CDR3L), theo thứ tự từ đầu cuối N đến đầu cuối C.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là thành phần thiết yếu của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và có thể bao gồm CDR1L bao gồm trình tự axit amin RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 119); CDR2L bao gồm trình tự axit amin X₄TX₅RLHS (SEQ ID NO: 120; X₄ và X₅ có thể được chọn từ tất cả các axit amin một cách tương ứng, và ví dụ, X₄ có thể là N, Q hoặc A, và X₅ có thể là S hoặc A) (ví dụ, NTSRLHS (SEQ ID NO: 121, NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), hoặc ATSRLLHS (SEQ ID NO: 124)); và CDR3L bao gồm trình tự axit amin QQSNMFPY (SEQ ID NO: 125).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa

và/hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và chất mang được dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng cần ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất ứng dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị, hoặc điều chế các tác nhân điều trị bệnh ung thư của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một phương án cụ thể, đối với được phẩm, phương pháp và việc sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được tạo ra dưới dạng hoạt chất đơn, được dùng đồng thời với vật liệu gây độc tế bào như các tác nhân điều trị bệnh ung thư, hoặc được tạo ra dưới dạng thể liên hợp được liên kết với vật liệu gây độc tế bào như các tác nhân điều trị bệnh ung thư (thể liên hợp kháng thể-thuốc; ADC).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện tế bào ung thư trong mẫu sử dụng kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Phương pháp phát hiện này có thể bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và bước phát hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể trong mẫu.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic. Vector tái tổ hợp có thể được sử dụng làm vector biểu hiện để biểu hiện phân tử axit nucleic trong tế bào chủ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic hoặc vector tái tổ hợp. Tế bào tái tổ hợp có thể thu được bằng cách biến nạp phân tử axit nucleic hoặc vector tái tổ hợp vào tế bào chủ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Phương pháp điều chế

này có thể bao gồm bước biểu hiện phân tử axit nucleic trong tế bào chủ. Bước biểu hiện này có thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào tái tổ hợp, và tùy ý, có thể còn bao gồm bước phân lập và/hoặc tinh chế kháng thể từ môi trường nuôi cấy tế bào thu được.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều chế kháng thể này có thể bao gồm:

(a) bước tạo ra tế bào tái tổ hợp được biến nạp với phân tử axit nucleic hoặc vector tái tổ hợp;

(b) bước nuôi cấy tế bào tái tổ hợp trong điều kiện và/hoặc khoảng thời gian đủ để biểu hiện phân tử axit nucleic; và

(c) bước phân lập và/hoặc tinh chế kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ các môi trường nuôi cấy thu được trong bước (b).

Giải pháp kỹ thuật

Như được mô tả ở trên, cần phải phát triển kỹ thuật để ức chế hoặc loại bỏ tế bào gốc ung thư để điều trị hoàn toàn bệnh ung thư, và để làm được điều này, cần lựa chọn chỉ thị tế bào gốc ung thư có thể phân lập tế bào gốc ung thư từ các tế bào khác.

Ở đây, lần đầu tiên đề xuất rằng CD43 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn. CD43 đã được biết dưới dạng chỉ thị tế bào máu trắng (bạch cầu) đặc trưng được giới hạn ở hầu hết các tế bào máu trắng, tế bào gốc tạo máu, và các tiểu cầu, ngoại trừ tế bào máu đỏ (hồng cầu), nhưng không được biết là được biểu hiện trên tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

Ngoài ra, đề xuất rằng kháng thể kháng CD43 nhận diện và/hoặc liên kết đặc hiệu với vùng đặc hiệu của miền ngoại bào của CD43 có tác dụng ức chế đối với tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

CD43 (cụm biệt hóa 43) được gọi là Leukosialin hoặc sialophorin, và là protein xuyên màng chủ yếu được biểu hiện trong bề mặt của hầu hết các nguyên

bào máu ngoại trừ tế bào máu đỏ (hồng cầu). CD43 có thể thu được từ động vật có vú bao gồm động vật linh trưởng như người (*Homo sapiens*), v.v., loài gặm nhấm như chuột nhắt (*Mus musculus*), v.v.. Ví dụ, CD43 có thể là CD43 ở người (ví dụ, số hiệu lưu giữ NCBI AAA51949.1 (gen (mARN): M61827.1), NP_001025459.1 (gen (mARN): NM_001030288.1), NP_003114.1 (gen: NM_003123.3), v.v.), CD43 ở chuột nhắt (ví dụ, số hiệu lưu giữ NCBI NP_001032899.1 (gen: NM_001037810.1), NP_033285.1 (gen: NM_009259.4), v.v.) và v.v.. Theo phương án này, CD43 có thể là CD43 ở người (protein: Số hiệu lưu giữ NCBI AAA51949.1 (SEQ ID NO: 130); gen (mARN): M61827.1).

Một phương án của sáng chế đề xuất được phẩm điều trị bệnh ung thư thể rắn chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư thể rắn, bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 cho đối tượng cần điều trị bệnh ung thư thể rắn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng để điều trị bệnh ung thư thể rắn của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 được đặc trưng bằng sự biểu hiện hoạt tính ức chế đối với tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

Do đó, một phương án của sáng chế đề xuất được phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của kháng thể kháng CD43

hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 cho đối tượng cần điều trị bệnh ung thư thể rắn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là kết quả xác nhận sự biểu hiện của CD43 trong dòng tế bào ung thư dạ dày ở người NCI-N87 (bên trái) và AGS (bên phải) bằng phương pháp nhuộm miễn dịch (Trục X: tỷ lệ biểu hiện CD43, trục Y: đọc số lượng tế bào).

Các hình vẽ từ Fig.2a đến Fig.2c là kết quả xác nhận sự biểu hiện của CD43 trong các dòng tế bào ung thư rắn khác nhau bằng phương pháp nhuộm miễn dịch (2a: dòng tế bào ung thư dạ dày; 2b: dòng tế bào ung thư trực tràng; 2c: dòng tế bào ung thư gan).

Fig.3 là kết quả xác nhận độ gây độc tế bào của thể liên hợp (kháng thể kháng CD43)-MMAE đối với dòng tế bào dạ dày người NCI-N87, SNU-719, và AGS.

Fig.4 là kết quả xác nhận độ gây độc tế bào của thể liên hợp (kháng thể kháng CD43)-DM1 đối với dòng tế bào dạ dày người NCI-N87, SNU-719, và AGS.

Fig.5 là kết quả xác nhận độ gây độc tế bào của thể liên hợp (kháng thể kháng CD43)-Duocarmyxin đối với dòng tế bào dạ dày người NCI-N87 và AGS.

Fig.6 là kết quả xác nhận tác dụng chống ung thư của kháng thể kháng CD43 một mình (DNP001) và thể liên hợp kháng thể kháng CD43-Duocarmyxin (D-Duo) trong mô hình động vật ung thư dạ dày trong đó dòng tế bào ung thư dạ dày ở người được ghép.

Fig.7 là kết quả xác nhận sự biểu hiện của epitop của CD43 trong các mô bệnh ung thư thể rắn khác nhau có nguồn gốc từ người bằng phương pháp hóa mô miễn dịch (M; tủy sống, C; vỏ não).

Fig.8 là kết quả xác nhận sự biểu hiện của epitop của CD43 theo bệnh ở các bệnh ung thư thể rắn khác nhau có nguồn gốc từ người bằng phương pháp hóa mô

miễn dịch (A; tế bào nhẵn đóng dấu (caxinom tế bào nhẵn đóng dấu ở dạ dày), B; caxinom tuyến ống thâm nhiễm ở vú, C; caxinom tuyến tụy, D; caxinom tế bào thận, E; caxinom tuyến phổi, F; caxinom thanh quản tế bào vảy, G; caxinom túi mật, H; caxinom cổ tử cung tế bào vảy, I; caxinom tử cung tế bào vảy, J; bệnh ung thư bàng quang tiết niệu, K; caxinom phổi tế bào vảy, L; sacôm tai bạch cầu hạt).

Fig.9 là kết quả xác nhận sự biểu hiện của CD43, CD44, và CD133 trong tế bào gốc ung thư của dòng tế bào ung thư dạ dày ở người NCI-N87 bằng phương pháp nhuộm miễn dịch.

Fig.10 là kết quả của phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch của mô tuyến ức với kháng thể đơn dòng kháng CD43 (YG5).

Fig.11 là biểu đồ của hệ thống đếm tế bào đã hoạt hóa dòng đo độ phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng CD43 (YG5) với tế bào tuyến ức.

Fig.12 là hình vẽ thể hiện sơ lược 11 loại đột biến làm khuyết CD43.

Fig.13 là kết quả thẩm tách tây xác nhận độ phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng CD43 (YG5) với 11 loại đột biến làm khuyết CD43.

Fig.14 là sơ đồ sơ lược thể hiện theo hướng minh họa quy trình tạo ra plasmit biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD43.

Fig.15 là biểu đồ thể hiện khả năng liên kết của kháng thể kháng CD43 với epitop của CD43, sau khi xử lý neuraminidaza vào tế bào máu bình thường.

Fig.16 là biểu đồ thể hiện kết quả của bước đo độ phản ứng chéo của kháng thể kháng CD43 với CEACAM5 và CEACAM6 tái tổ hợp.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của epitop của CD43 trong tế bào gốc khối u (khối u cầu).

Fig.18 là biểu đồ thể hiện độ gây độc tế bào của kháng thể kháng CD43 với tế bào CEM7 hoặc CCRF-CEM (biểu hiện epitop của CD43 ở mức thấp), và cho thấy rằng kháng thể kháng CD43 không có tính gây độc tế bào trực tiếp.

Fig.19 là biểu đồ thể hiện khả năng sống sót của tế bào đích được điều trị bằng kháng thể kháng JL-1 dính độc tố (kháng thể kháng JL-1 liên hợp saporin), và cho thấy rằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình diễn ra nhờ kháng thể kháng JL-1 liên hợp saporin.

Fig.20 là biểu đồ thể hiện hiện tượng nội hấp của kháng thể kháng JL-1 (kháng thể kháng CD43) (cả kháng thể chuột, người) trong thử nghiệm gây chết tế bào theo chương trình được mô tả trên Fig.19, và kết quả thu được bằng phép phân tích với thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy. Đối với việc này, kháng thể JL-1 chuột nhất được xử lý vào tế bào trong khi làm lạnh trong 30 phút và được di chuyển ở điều kiện nhiệt độ 37°C, và sau đó 10^6 tế bào được gom lại ở mỗi thời điểm được biểu thị trên trục X của biểu đồ và kháng thể thứ hai kháng IgG chuột nhất-PE được xử lý ở nhiệt độ làm lạnh trong 10 phút, và các tế bào được rửa và cố định.

Fig.21 là hình ảnh thể hiện hiện tượng kết tập cùng loại được cảm ứng bởi kháng thể kháng JL-1 trong tế bào biểu hiện kháng nguyên CD43. Hình ảnh này thu được bằng cách chụp các ảnh hiển vi theo thời gian đã sắp xếp, sau khi xử lý kháng thể kháng JL-1 vào 300000 tế bào một cách tương ứng ở nồng độ bắt đầu là 40µg/mL và nuôi cấy chúng trong điều kiện là 37°C và CO₂ 5%, và Fig.21 là hình ảnh thu được tại 2 giờ sau khi xử lý kháng thể.

Fig.22 là kết quả thể hiện kháng nguyên JL-1 thấp và khác loại biểu hiện trong tế bào tủy xương bình thường. Các bạch cầu đơn nhân của tủy xương bình thường được nhuộm với kháng thể chuột nhất kháng JL-1, và sau đó được nhuộm với F(ab)₂-PE dê kháng IgG chuột nhất, và được quan sát. Biểu đồ chồng được biểu thị bằng cách giới hạn đến các tế bào lympho.

Fig.23 thể hiện tỷ lệ biểu hiện của kháng nguyên JL-1 trong tế bào máu ngoại vi. Hai mẫu PBMC người bình thường được nhuộm với kháng thể chuột nhất kháng JL-1 người (dòng màu xanh: (d)), và sự biểu hiện ở mức thấp kháng nguyên JL1 được quan sát

Fig.24 là biểu đồ thể hiện kết quả của phép đo mức độ hình thành cụm của các tiểu quần thể tủy xương trong trường hợp xử lý kháng thể kháng JL-1 liên kết với saporin vào tế bào tủy xương bình thường khi xử lý sơ bộ (JL1+) và trường hợp không xử lý. Xác nhận được rằng cụm tiểu quần thể tủy xương không được tạo ra trong trường hợp xử lý sơ bộ kháng thể kháng JL-1 liên hợp saporin vào tế bào tủy xương bình thường. Kết quả được đo sau khi phân lập tủy xương và thu gom các tế bào máu trắng (bạch cầu), và phân lập và thu gom các tế bào CD34+ bằng cách phân

loại thành JL-1 dương và âm, và đưa các tế bào đã thu gom vào MethoCult với xytokin.

Fig.25 là biểu đồ thể hiện tác dụng điều trị bệnh của bản thân kháng thể kháng JL1 và kháng thể kháng JL1 liên hợp độc tố trong mô hình dị ghép ALL bạch cầu ác tính, Fig.25A thể hiện kết quả trong mô hình bạch cầu ác tính CEM7 và Fig.25B thể hiện kết quả trong mô hình NALM-6 (Dòng tế bào: NALM6 (B-ALL)), theo thứ tự. Thử nghiệm này được thực hiện trong các điều kiện sau: Chuột nhắt: NOD-SCID (8/nhóm); cấy truyền: 0 ngày 10^7 tế bào; dùng: 15 μ g/lần tiêm + 100 μ g IgG khối i.v. 1 lần/tuần bắt đầu từ ngày 8; điểm cuối: trạng thái liệt.

Fig.26 thể hiện mức độ biểu hiện của JL-1 trong nguyên bào AML chính và tiểu quần thể.

Fig.27 là biểu đồ thể hiện tác dụng gây chết tế bào theo chương trình bởi JL-1 đã được nhân hóa dạng khảm (ADCC và CDC), và Fig.27A là kết quả của phép đo độ gây độc tế bào bằng cách sử dụng Cell Titer Glo. Dòng tế bào CEM7 được nuôi cấy với tế bào tác động (PBMC) và sau đó kháng thể khảm JL-1 hoặc kháng thể đối chứng được bổ sung. Fig.27B là kết quả của phép đo độ gây độc tế bào bằng cách sử dụng Cell Titer Glo. Dòng tế bào CEM7 được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy và kháng thể khảm JL1 được bổ sung cùng với bộ thể thử. Để làm nhóm đối chứng, kháng thể isotyp IgG1 không liên quan đến thử nghiệm được sử dụng.

Fig.28 là kết quả cho thấy rằng hoạt tính ADCC của kháng thể khảm JL-1 được làm tăng lên khi được khử fucosyl hóa.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện tác dụng của kháng thể khảm trần trong dòng tế bào CEM7 *in vivo*.

Fig.30 là kết quả thể hiện sự biểu hiện của JL1 trong tiểu quần thể tế bào gốc bạch cầu ác tính (LSC).

Fig.31 là biểu đồ thể hiện kết quả của phép phân tích tạo thành cụm bởi kháng thể kháng JL1 được liên hợp với độc tố (saporin: SAP) *in vitro* (CCC) (số lượng cụm trung bình), và nó thể hiện tác dụng gây chết tế bào theo chương trình gia tăng của AML dương tính với kháng nguyên. Tế bào này được cho vào chất nền cụm của tế bào gốc với JL1-saporin hoặc IgG1 chuột nhắt-saporin và quá trình tạo

thành cụm được quan sát.

Fig.32 là biểu đồ thể hiện tác dụng là kháng thể kháng JL1 được liên hợp với độc tố (saporin: SAP) *in vitro* (CCC) ảnh hưởng đến sự tăng sinh của AML chính dương tính với kháng nguyên.

Fig.33 là biểu đồ thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư AML chính bằng kháng thể liên kết với độc tố ở chuột nhắt NSG (*in vitro*), 5×10^7 tế bào tủy xương được thu từ bệnh nhân AML JL-1⁺ và được tiêm trong tĩnh mạch vào 30 con chuột nhắt NSG đã được chiếu xạ. Sau 8 tuần, 45μg liều JL1-debougananin (DB), hIgG1-DB, hoặc PBS được dùng cho chuột nhắt hằng tuần, và tủy xương và lá lách được thu gom, và được đưa vào cấy ghép và quá trình hình thành khối u được quan sát.

Fig.34 và Fig.35 là các kết quả xác nhận rằng các kháng thể được nhân hóa/được cải biến tối ưu hóa khác nhau thể hiện profin liên kết bằng nhau, so với kháng thể JL-1 (chuột nhắt) ban đầu. Tế bào CEM7 được nhuộm với kháng thể JL-1 gốc ban đầu hoặc 3 loại kháng thể được cải biến bằng cách nhân hóa để quan sát. Do đó, Fig.43 chỉ ra rằng "Combo A" đã cải biến thể hiện profin tốt nhất, nhưng tất cả các kháng thể thử nghiệm khác thể hiện mức độ gây độc tế bào đáng kể trong tế bào CEM7. Fig.35 thể hiện kết quả của phép phân tích độ gây độc tế bào nội hấp của 3 kháng thể được cải biến cuối, và độ gây độc tế bào được đo vào 3 ngày sau khi trộn kháng thể đó hoặc IgG kháng người-saporin.

Fig.36 thể hiện kết quả của việc sắp xếp trình tự axit amin của dòng vô tính 2 vòng và 3 vòng tốt nhất, là việc so sánh các trình tự axit amin của dòng vô tính gốc và dòng vô tính được nhân hóa hơn nữa, theo thứ tự. Trong số đó, 153-28 thu được từ 36-10 Q6R, và 257-10 thu được từ 45-37. CDR được biểu thị bằng phong chữ in đậm và gạch chân.

Fig.37a là biểu đồ thể hiện mức độ liên kết của ứng viên hàng đầu ART140 với IgG trong tế bào CEM7 dương tính với JL-1 bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy, và Fig.37b là biểu đồ thể hiện kết quả trong nhóm đối chứng âm, tế bào U937.

Fig.38a là biểu đồ thể hiện mức độ liên kết của ứng viên hàng đầu ART140 với IgG trong tế bào CEM7 dương tính với JL-1 bằng ELISA dựa trên tế bào (tế bào

sống trong huyền phù) và Fig.38b là biểu đồ thể hiện kết quả trong nhóm đối chứng âm, tế bào U937.

Fig.39a là biểu đồ thể hiện mức độ liên kết của nhóm ứng viên hàng đầu và IgG của thể đột biến Quikchange với CEM dương tính với JL-1 bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy, và Fig.39b là biểu đồ thể hiện kết quả trong nhóm đối chứng âm, tế bào U937.

Các hình vẽ từ Fig.40a đến Fig.40c là các biểu đồ thể hiện mức độ liên kết của IgG của thể đột biến Quikchange với CEM dương tính với JL-1 bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Các hình vẽ từ Fig.41a đến Fig.41c là các biểu đồ thể hiện kết quả xác nhận IgG của thể đột biến Quikchange liên kết với CEM dương tính với JL-1 bằng ELISA dựa trên tế bào (tế bào sống trong huyền phù).

Fig.42 là biểu đồ thể hiện hoạt tính liên kết epitop của kháng thể khảm DNP001.

Fig.43 thể hiện theo hướng minh họa axit amin của vùng glycan trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ cần được thay thế để tạo ra kháng thể với biến thể trong đó gốc axit amin của vùng glycan của kháng thể được nhân hóa được làm khuyết.

Fig.44 là kết quả của các biến thể thâm tách tây bằng cách sử dụng Concanavalin A-HRP liên kết với vùng glycan đối với kháng thể với biến thể trong đó gốc axit amin của vùng glycan của kháng thể được nhân hóa được làm khuyết.

Fig.45 là biểu đồ thể hiện khả năng liên kết của kháng thể với biến thể trong đó gốc axit amin của vùng glycan của kháng thể được nhân hóa được làm khuyết.

Fig.46 là biểu đồ thể hiện khả năng liên kết của kháng thể khảm kháng CD43 và kháng thể kháng CD43 được nhân hóa trong đó gốc axit amin của vùng glycan được làm khuyết, với tế bào dương tính với kháng nguyên (CD43), tế bào CEM7.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ở đây, trừ khi có quy định khác, epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 có thể có nghĩa là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131:

SEQ ID NO: 131: Pro Leu Trp Thr Ser Ile.

Epitop có thể được định vị trong miền ngoại bào của protein CD43, nhưng có thể không được lộ ra môi trường bên ngoài trong điều kiện bình thường, và có thể được lộ ra bên ngoài, nếu tế bào trở thành tế bào ung thư hoặc tế bào gốc ung thư. Do đó, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó nhận diện đặc hiệu và/hoặc liên kết đặc hiệu với epitop có thể hướng đích và/hoặc ức chế đặc hiệu tế bào ung thư và/hoặc tế bào gốc ung thư.

Miền ngoại bào của CD43 trong đó epitop được định vị có thể là vùng axit amin từ thứ 73 đến thứ 81 của CD43 (AAA51949.1; SEQ ID NO: 130) (SEQ ID NO: 134). Do đó, epitop có thể là vùng axit amin liên tục từ 6 đến 9 bao gồm SEQ ID NO: 131 trong SEQ ID NO: 134 của CD43 (AAA51949.1).

Epitop có thể có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: từ 131 đến 134, và ví dụ, có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 134:

SEQ ID NO: 132: Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile;

SEQ ID NO: 133: Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile;

SEQ ID NO: 134: Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm tất cả các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nhận diện epitop được đề cập ở trên hoặc liên kết đặc hiệu với nó.

Ở đây, thuật ngữ “JL-1” được sử dụng với nghĩa của CD43 hoặc epitop được đề cập ở trên của CD43.

Ở đây, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được chọn từ nhóm gồm kháng thể có nguồn gốc từ động vật, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người (nhân hóa) và mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Kháng thể có thể được sản xuất tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

Khi kháng thể được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn cho động vật được dùng cho người nhằm mục đích điều trị bệnh, hệ thống miễn nhiễm thường có thể xuất hiện. Để ức chế hệ thống miễn nhiễm, kháng thể khảm được phát triển. Trong kháng thể khảm, vùng hằng định của kháng thể có nguồn gốc từ động vật gây ra phản ứng kháng isotyp được thay thế bằng vùng hằng

định của kháng thể người bằng kỹ thuật di truyền. Kháng thể khảm được cải thiện đáng kể về phản ứng kháng isotyp so với kháng thể có nguồn gốc từ động vật, nhưng ngoài ra, vẫn có tác dụng phụ tiềm tàng của phản ứng kháng idiotyp, do axit amin có nguồn gốc từ động vật có trong vùng biến đổi. Kháng thể được nhân hóa được phát triển để cải thiện các tác dụng phụ này. Kháng thể này được cấu trúc bằng cách ghép CDR (vùng quyết định tính bổ trợ) đóng vai trò liên kết kháng nguyên trong vùng biến đổi của kháng thể khảm vào khung kháng thể người.

Vấn đề quan trọng nhất đối với kỹ thuật ghép CDR để cấu trúc kháng thể được nhân hóa là lựa chọn kháng thể người được tối ưu hóa có thể tiếp nhận CDR của kháng thể có nguồn gốc từ động vật tốt nhất, và để làm được điều này, sử dụng cơ sở dữ liệu kháng thể, phân tích cấu trúc tinh thể, kỹ thuật tạo mẫu phân tử, v.v., được sử dụng. Tuy nhiên, ứng dụng của kỹ thuật thiết kế kháng thể bổ sung để khôi phục lại khả năng liên kết kháng nguyên là cần thiết, do axit amin được định vị trên khung kháng thể có nguồn gốc từ động vật có thể ảnh hưởng đến liên kết kháng nguyên, mặc dù ghép CDR của kháng thể có nguồn gốc từ động vật vào khung kháng thể người được tối ưu hóa, và do đó có nhiều trường hợp trong đó khả năng liên kết kháng nguyên không được bảo toàn.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được phân lập từ cơ thể sống (không có trong cơ thể sống) hoặc có thể không xuất hiện trong tự nhiên, ví dụ, có thể được sản xuất tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

Ở đây, “kháng thể” có nghĩa là vật liệu được sản xuất bằng cách kích thích kháng nguyên trong hệ miễn dịch, và loại của nó không bị giới hạn cụ thể, và có thể thu được trong tự nhiên hoặc không phải trong tự nhiên (ví dụ, tổng hợp hoặc tái tổ hợp). Kháng thể có lợi để biểu hiện và sản xuất quy mô lớn, do nó rất ổn định in vitro và in vivo và thời gian bán thải của nó dài. Ngoài ra, kháng thể có cấu trúc đime, và do đó, ái tính của nó rất cao.

Kháng thể hoàn thiện có cấu trúc gồm có hai chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, và mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với chuỗi nặng bằng các liên kết disulfua. Vùng hằng định của kháng thể được chia thành vùng hằng định chuỗi nặng và vùng không biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng không biến đổi

chuỗi nặng thuộc các loại gama (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ) và epsilon (ϵ) và có gama1 (γ_1), gama2 (γ_2), gama3 (γ_3), gama4 (γ_4), alpha1 (α_1) và alpha2 (α_2) là các lớp phụ (phân lớp). Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có các loại kapa (κ) và lamda (λ).

Thuật ngữ, “chuỗi nặng” được giải thích là bao gồm tất cả các chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bao gồm miền biến đổi V_H bao gồm trình tự axit amin chứa trình tự vùng biến đổi đủ để tạo ra đặc hiệu đối với kháng nguyên, 3 trong số các miền của vùng hằng định C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} và vùng bản lề, và các mảnh của nó. Ngoài ra, thuật ngữ, “chuỗi nhẹ” được giải thích là bao gồm tất cả các chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ bao gồm miền biến đổi V_L bao gồm trình tự axit amin chứa trình tự vùng biến đổi đủ để tạo ra đặc hiệu đối với kháng nguyên, và miền của vùng hằng định C_L , và các mảnh của nó.

Thuật ngữ "CDR (vùng quyết định tính bổ trợ)" có nghĩa là trình tự axit amin của vùng siêu biến của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể bao gồm 3 CDR, một cách tương ứng ($CDRH_1$, $CDRH_2$, $CDRH_3$ và $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRL_3$). CDR có thể tạo ra gốc tiếp xúc chính để liên kết CDR với kháng nguyên hoặc epitop. Nói cách khác, ở đây, thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “nhận diện đặc hiệu” có nghĩa tương tự như đã được biết công khai bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có nghĩa là kháng nguyên và kháng thể tương tác đặc hiệu và tiến hành phản ứng miễn dịch.

Thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” là mảnh trong toàn bộ cấu trúc của globulin miễn dịch, và có nghĩa là một phần polypeptit chứa phần trong đó kháng nguyên có thể liên kết. Ví dụ, nó có thể là scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' hoặc F(ab')₂, nhưng không giới hạn ở đó.

Fab của mảnh liên kết kháng nguyên là cấu trúc chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng hằng định của chuỗi nhẹ và vùng hằng định thứ nhất của chuỗi nặng (C_{H1}), và có 1 mảnh liên kết kháng nguyên. Fab' khác với Fab ở chỗ nó có vùng bản lề chứa một hoặc nhiều gốc xystein ở đầu cuối C của miền C_{H1} chuỗi nặng. F(ab')₂ kháng thể được sản xuất bằng cách tạo ra mảnh liên kết kháng nguyên giữa các gốc xystein của vùng bản lề. Fv là mảnh kháng thể tối thiểu chỉ có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và kỹ thuật tái tổ hợp để sản xuất

mảnh Fv đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong Fv hai chuỗi, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết bằng các liên kết không phải cộng hóa trị, và trong Fv chuỗi đơn, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi đơn được liên kết bằng liên kết cộng hóa trị thường thông qua tác nhân liên kết peptit hoặc được liên kết trực tiếp ở đầu cuối C, do đó nó có thể tạo ra cùng cấu trúc với Fv hai chuỗi. Tác nhân liên kết này có thể là tác nhân liên kết peptit gồm từ 1 đến 100 hoặc từ 2 đến 50 axit amin bất kỳ, và trình tự thích hợp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mảnh liên kết kháng nguyên có thể thu được bằng sử dụng proteinaza (ví dụ, khi toàn bộ kháng thể được cắt giới hạn bằng papain, Fab có thể thu được, và khi được phân cắt bằng pepsin, mảnh $F(ab')_2$ có thể thu được), và có thể được cấu trúc bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen.

Thuật ngữ “vùng bản lề” là một vùng trong chuỗi nặng của kháng thể, và có trong các vùng giữa CH1 và CH2, có nghĩa là vùng có chức năng tạo ra tính linh động của mảnh liên kết kháng nguyên trong kháng thể. Ví dụ, vùng bản lề có thể thu được từ kháng thể người, và cụ thể là, có thể thu được từ IgA, IgE, hoặc IgG, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG 3, hoặc IgG4.

Kháng thể kháng CD43 có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng, và ví dụ, có thể là kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, nó có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật hiển thị thể thực khuẩn.

Mặt khác, kháng thể đơn dòng riêng lẻ có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng dạng ELISA điển hình (Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym) dựa trên khả năng liên kết với CD43. Hoạt tính ức chế có thể được thử nghiệm bằng các phép phân tích chức năng để thử nghiệm sự tương tác phân tử của tổ hợp như ELISA cạnh tranh, thử nghiệm dựa trên tế bào, phân tích Scatchard, hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt, v.v.. Sau đó, ái lực với CD43 (trị số Kd) đối với mỗi thành viên kháng thể đơn dòng được lựa chọn dựa trên hoạt tính ức chế mạnh có thể được thử nghiệm.

Ví dụ, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể có ái lực liên kết (Kd; ví dụ, được đo bằng phép phân tích Scatchard) với CD43

(ví dụ, CD43 ở người, CD43 ở chuột nhắt, v.v.) hoặc epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 bằng 1 mM hoặc nhỏ hơn, 100 nM hoặc nhỏ hơn, 10 nM hoặc nhỏ hơn, 5 nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 3 nM hoặc nhỏ hơn, ví dụ, từ 1 pM đến 1 mM, từ 1 pM đến 100 nM, từ 1 pM đến 10 nM, từ 1 pM đến 5 nM, từ 1 pM đến 3 nM, từ 10 pM đến 1 mM, từ 10 pM đến 100 nM, từ 10 pM đến 10 nM, từ 10 pM đến 5 nM, từ 10 pM đến 3 nM, từ 100 pM đến 1 mM, từ 100 pM đến 100 nM, từ 100 pM đến 10 nM, từ 100 pM đến 5 nM, từ 100 pM đến 3 nM, từ 1 nM đến 1 mM, từ 1 nM đến 100 nM, từ 1 nM đến 10 nM, từ 1 nM đến 5 nM, hoặc từ 1 nM đến 3 nM.

Một phương án đề xuất dòng tế bào lai tạo ra kháng thể đơn dòng kháng CD43. Dòng tế bào lai có thể là dòng tế bào H-JL1 với số hiệu lưu giữ KCLRF-BP-00010.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được áp dụng với một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v..

Do đó, dược phẩm còn có thể bao gồm một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., ngoài kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Hơn thế nữa, phương pháp điều trị và/hoặc ức chế có thể còn bao gồm bước dùng một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., ngoài bước dùng kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Cụ thể, một phương án của sáng chế đề xuất dược phẩm điều trị bệnh ung thư thể rắn chứa (1) kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 và (2) một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư thể rắn bao gồm (1) bước dùng một lượng hữu hiệu dược phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 cho đối tượng cần điều trị bệnh ung thư thể rắn, và (2) bước dùng một lượng hữu hiệu dược phẩm của một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., cho đối tượng cần điều trị bệnh ung

thư thể rắn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm (i) kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 và (ii) một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., làm hoạt chất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm (i) bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 cho bệnh nhân bị bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư thể rắn bệnh nhân, và (ii) bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., cho bệnh nhân bị bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư thể rắn bệnh nhân.

Đối với được phẩm, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., có thể được bào chế dưới dạng một chế phẩm bằng cách liên hợp với nhau hoặc được trộn, hoặc được bào chế dưới dạng chế phẩm riêng rẽ một cách tương ứng và được trộn. Đối với phương pháp này, bước dùng kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., có thể được tiến hành đồng thời hoặc theo thứ tự không liên quan đến thứ tự.

Vật liệu gây độc tế bào có thể là tất cả các vật liệu có tính độc với tế bào ung thư, cụ thể là, tế bào ung thư rắn, và có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm chất đồng vị phóng xạ, hợp chất gây độc tế bào (phân tử nhỏ), protein gây độc tế bào, tác nhân điều trị bệnh ung thư, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Protein gây độc tế bào có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm rixin, saporin, gelonin, momordin, debouganin, độc tố bạch hầu, độc tố pseudomonas, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Chất đồng vị phóng xạ có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm ^{131}I , ^{188}Rh , ^{90}Y , v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Hợp chất gây độc tế

bào có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm duocarmyxin, monomethyl auristatin E (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF), N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)maytansin (DM1), PBD (Pyrolobenzodiazepin) dime, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào, v.v., có thể được sử dụng dưới dạng thể liên hợp hoặc protein dung hợp (trong trường hợp mà vật liệu gây độc tế bào và/hoặc vật liệu chỉ thị là các protein) được liên kết với nhau (ví dụ, bằng liên kết cộng hóa trị, liên kết peptit, v.v.). Sự liên hợp giữa kháng thể (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên) và vật liệu gây độc tế bào có thể là theo kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này thuộc về sáng chế.

Hoạt chất (kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và/hoặc vật liệu gây độc tế bào và/hoặc vật liệu chỉ thị) có thể được áp dụng (được dùng) với chất mang được dùng, và chất mang được dùng thường được sử dụng để bào chế thuốc, và có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, cao su acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, xenluloza, nước, si-rô, methyl xenluloza, methylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, bột talc, magie stearat, dầu khoáng, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Kháng thể kháng CD43 còn có thể bao gồm một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm chất pha loãng, tá dược, chất làm trơn, chất giữ độ ẩm, chất làm ngọt, chất tạo hương, chất nhũ hóa, huyền phù, chất bảo quản, v.v., thường được sử dụng để điều chế dược phẩm khác với các thành phần.

Hoạt chất hoặc dược phẩm có thể được dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Trong trường hợp dùng ngoài đường tiêu hóa, nó có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, dùng trong nội bì, dùng khu trú, dùng trong mũi, dùng trong phổi, hoặc dùng trong trực tràng, v.v.. Trong trường hợp dùng qua đường miệng, chế phẩm dùng qua đường miệng nên được phủ hoặc được bào chế đối với thuốc có hoạt tính được bảo vệ khỏi sự phân hủy trong dạ dày, do protein hoặc peptit được tiêu hóa. Ngoài ra, kháng thể

kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được dùng bằng thiết bị bất kỳ mà nhờ đó vật liệu có hoạt tính có thể được phân phối đến tế bào đích.

Ở đây, “lượng hữu hiệu dược phẩm” có nghĩa là lượng thể hiện tác dụng có ý nghĩa điều trị bệnh của thuốc. Một lượng hữu hiệu dược phẩm của hoạt chất đối với liều đơn có thể được kê đơn khác nhau theo các yếu tố như phương pháp bào chế, cách dùng, độ tuổi, cân nặng, giới tính, tình trạng bệnh của bệnh nhân, thức ăn, thời gian dùng, khoảng thời gian dùng, đường dùng, tốc độ bài tiết và tính nhạy cảm. Ví dụ, một lượng hữu hiệu dược phẩm của hoạt chất (ví dụ, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) đối với liều đơn có thể là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg, hoặc từ 0,02 đến 10 mg/kg, nhưng không giới hạn ở đó. Lượng hữu hiệu dược phẩm liều đơn có thể được bào chế dưới dạng một chế phẩm ở dạng dung tích đơn vị, được bào chế ở các lượng thích hợp, hoặc được điều chế bằng cách đổ đầy vật chứa đa dung tích.

Bệnh ung thư thể rắn có thể có nghĩa là tất cả bệnh ác tính không liên quan đến máu khác với bệnh máu ác tính. Ví dụ, bệnh ung thư thể rắn có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư phổi (ví dụ, caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tuyến ở phổi, caxinom tế bào vảy ở phổi), bệnh ung thư màng bụng, bệnh ung thư da, u hắc sắc tố trong da hoặc nhân cầu, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư gần hậu môn, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư tuyến nội tiết, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacôm mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư ruột già, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư màng trong dạ con, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, sacôm xương, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Ví dụ, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư ruột già, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư

thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, hoặc bệnh ung thư bàng quang. Bệnh ung thư này không chỉ bao gồm bệnh ung thư tiên phát mà còn bao gồm bệnh ung thư di căn. Ngoài ra, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư có tính kháng với các tác nhân điều trị bệnh ung thư thông thường (ví dụ, tác nhân điều trị bệnh ung thư phân tử nhỏ (hóa chất chống ung thư), tác nhân chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, thuốc kháng sinh, vinca alkaloid, enzym, hoóc môn, tác nhân trị liệu đích, và/hoặc tác nhân trị liệu kháng thể, v.v.), và có thể là bệnh ung thư tái phát sau khi điều trị bằng các tác nhân điều trị bệnh ung thư thông thường (ví dụ, tác nhân điều trị bệnh ung thư phân tử nhỏ (hóa chất chống ung thư), tác nhân chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, thuốc kháng sinh, vinca alkaloid, enzym, hoóc môn, tác nhân trị liệu đích, và/hoặc tác nhân trị liệu kháng thể, v.v.).

Tác dụng điều trị đối với bệnh ung thư thể rắn không chỉ bao gồm sự ức chế sinh trưởng (sự giảm định lượng) và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của tế bào ung thư (cụ thể là, tế bào gốc ung thư) hoặc mô ung thư chứa chúng, mà còn bao gồm tác dụng ức chế đối với sự làm giảm bệnh ung thư bằng cách ức chế sự di trú, xâm lấn, di căn, v.v..

Ở đây, “việc ức chế tế bào gốc ung thư” có nghĩa tất cả sự ức chế chức năng và/hoặc định lượng của tế bào gốc ung thư như sự ức chế sinh trưởng (sự giảm định lượng), cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, v.v., và/hoặc điều trị và/hoặc cải thiện bệnh ung thư trong đó tế bào gốc ung thư được bao gồm.

Ở đây, “bệnh nhân” có nghĩa là bệnh nhân cần điều trị bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư thể rắn hoặc bệnh máu ác tính), và/hoặc sự ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, và có thể là tất cả động vật có vú, ví dụ, người, và có thể là bệnh nhân bị bệnh ung thư, có các triệu chứng của bệnh ung thư, hoặc có nguy cơ tiến triển bệnh ung thư, hoặc tế bào, mô, dịch thể, hoặc môi trường nuôi cấy chúng được phân lập từ đó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp trong đó kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 và tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung

thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với tế bào gốc ung thư. Một phương án đề xuất phương pháp tạo ra thể liên hợp trong đó kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với tế bào gốc ung thư, bao gồm bước tiếp xúc kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43 với mẫu bệnh ung thư, ví dụ, mẫu bệnh ung thư thể rắn hoặc dùng nó cho bệnh nhân bị bệnh ung thư, như bệnh ung thư thể rắn bệnh nhân. Phương pháp này có thể được tiến hành in vivo hoặc in vitro. Thể liên hợp hoặc phương pháp tạo ra tương tự có thể được sử dụng cho các mục đích lâm sàng, chẩn đoán, và/hoặc thử nghiệm cũng như việc điều trị bệnh ung thư thể rắn. Ví dụ, nó có thể được sử dụng để xác nhận sự tồn tại của tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn và/hoặc sự hiển thị về tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bằng cách xác định xem liệu phức hợp có được tạo ra khi kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tiếp xúc với mẫu bệnh ung thư. Sau đó, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể còn bao gồm vật liệu chỉ thị (chất đánh dấu). Vật liệu chỉ thị có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm chất đồng vị phóng xạ, vật liệu huỳnh quang, nhóm màu, thuốc nhuộm, v.v.. Vật liệu huỳnh quang có thể là tất cả các vật liệu huỳnh quang thường có sẵn, và ví dụ, có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm fluorescein isothiocyanat (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC) hoặc biotin, nhưng không giới hạn ở đó. Vật liệu chỉ thị có thể được kết hợp (được liên kết) với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bằng các phương pháp phổ biến (ví dụ, các liên kết hóa học như liên kết cộng hóa trị, liên kết phối trí, liên kết ion, v.v.). Sự kết hợp của kháng thể (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên) và vật liệu chỉ thị có thể là theo kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật thuộc về sáng chế.

Mẫu bệnh ung thư có thể là dòng tế bào ung thư hoặc tế bào, mô, dịch thể,

v.v., được phân lập từ bệnh nhân bị bệnh ung thư hoặc được nuôi cấy nhân tạo. Mẫu bệnh ung thư thể rắn có thể là dòng tế bào ung thư rắn hoặc tế bào, mô, dịch thể, v.v., được phân lập từ bệnh nhân bị bệnh ung thư thể rắn hoặc được nuôi cấy nhân tạo.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng làm chỉ thị để phát hiện tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn của CD43, cụ thể epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Cụ thể, một phương án đề xuất chế phẩm để phát hiện tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm vật liệu tương tác với CD43, cụ thể epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Một phương án đề xuất phương pháp phát hiện tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn bao gồm bước tiếp xúc vật liệu tương tác với CD43, cụ thể epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và bước đo xem liệu CD34, cụ thể epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, có tương tác với vật liệu hoặc mức độ của chúng. Trong trường hợp này, khi tương tác giữa CD43, cụ thể epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và vật liệu có mặt, hoặc mức của nó cao, mẫu tế bào này có thể được quyết định (được xác định) là bao gồm tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn. Vật liệu tương tác có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm tất cả các vật liệu mà có thể tương tác với CD43, cụ thể epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, ví dụ, vật liệu hóa học (hóa chất phân tử nhỏ), kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, aptame, v.v.. Liệu có sự tương tác, có thể được đo bởi các phương pháp phân tích protein phổ biến sử dụng vật liệu tương tác, ví dụ, sắc ký miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang (LIA), kỹ thuật tách protein, sự lai huỳnh quang *in situ* (FISH)-, đếm tế bào theo dòng chảy, phương pháp vi dây, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Mẫu tế bào này có thể là mô, tế bào, hoặc môi trường nuôi cấy của chúng được phân lập từ động vật có vú, ví dụ, người, và ví dụ, có thể là tế bào ung

thư, mô ung thư, hoặc môi trường nuôi cấy của chúng được phân lập từ bệnh nhân bị bệnh ung thư, ví dụ, bệnh nhân bị bệnh ung thư thể rắn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất cách sử dụng để sàng lọc các chất trị liệu bệnh ung thư thể rắn chứa epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tác nhân để sàng lọc các chất chống bệnh ung thư thể rắn bao gồm epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc các tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn bao gồm bước cho hợp chất dự tuyển tiếp xúc với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và bước lựa chọn hợp chất dự tuyển liên kết với epitop để xác định nó là chất dự tuyển để điều trị bệnh ung thư thể rắn.

Tác nhân (chất) trị liệu bệnh ung thư thể rắn được sàng lọc như trên có thể được đặc trưng bởi có tác dụng ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

Do đó, theo một phương án khác, sáng chế đề xuất cách sử dụng để sàng lọc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, của epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tác nhân để sàng lọc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư của bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, của epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, bao gồm bước cho hợp chất dự tuyển tiếp xúc với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43, và bước lựa chọn hợp chất dự tuyển liên kết với epitop để xác định nó là vật liệu dự tuyển của tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

Hợp chất dự tuyển liên kết với epitop có thể có ái lực liên kết với epitop (K_d ; ví dụ, được đo bằng phép phân tích Scatchard) bằng 1 mM hoặc nhỏ hơn, 100 nM

hoặc nhỏ hơn, 10 nM hoặc nhỏ hơn, 5 nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 3 nM hoặc nhỏ hơn, ví dụ, từ 1 pM đến 1 mM, từ 1 pM đến 100 nM, từ 1 pM đến 10 nM, từ 1 pM đến 5 nM, từ 1 pM đến 3 nM, từ 10 pM đến 1 mM, từ 10 pM đến 100 nM, từ 10 pM đến 10 nM, từ 10 pM đến 5 nM, từ 10 pM đến 3 nM, từ 100 pM đến 1 mM, từ 100 pM đến 100 nM, từ 100 pM đến 10 nM, từ 100 pM đến 5 nM, từ 100 pM đến 3 nM, từ 1 nM đến 1 mM, từ 1 nM đến 100 nM, từ 1 nM đến 10 nM, từ 1 nM đến 5 nM, hoặc từ 1 nM đến 3 nM.

Epitop là như được đề cập ở trên và có thể có trình tự axit amin được lựa chọn trong SEQ ID NO: từ 131 đến 134. Epitop có thể được tạo ra dưới dạng toàn bộ protein CD43 hoặc một phần bao gồm epitop, hoặc được tổng hợp hóa học hoặc được sản xuất tái tổ hợp.

Hợp chất dự tuyển có thể được tổng hợp nhân tạo hoặc có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm các loại tự nhiên, khác nhau của các hợp chất, polypeptit, oligopeptit, cấu trúc peptit hoặc cấu trúc protein (ví dụ, kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, kháng thể peptit, kháng thể nano (nanobody), v.v.), polynucleotit, oligonucleotit, ARN đối nghĩa, shARN (ARN kẹp tóc ngắn), siARN (ARN gây nhiễu nhỏ), aptame, dịch chiết tự nhiên, v.v..

Sự kết hợp của hợp chất dự tuyển và epitop có thể được tiến hành bằng cách xác nhận sự tạo thành phức hợp của hợp chất dự tuyển và epitop, và nó có thể được tiến hành bằng các phương pháp khác nhau đã được biết phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, nó có thể được đo bằng phản ứng enzym phổ biến, huỳnh quang, phát quang và/hoặc sự dò bức xạ, và cụ thể là, có thể được đo bằng phương pháp được chọn từ nhóm gồm sắc ký miễn dịch, hóa mô miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang (LIA), kỹ thuật thẩm tách protein, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án, tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn hoặc tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư được sàng lọc như trên có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, cấu trúc protein giống kháng thể (ví dụ, kháng thể peptit, kháng thể nano), v.v..

Theo một phương án khác, được phẩm điều trị bệnh ung thư thể rắn chứa tác nhân điều trị bệnh ung thư thể rắn được sàng lọc như trên được đề xuất. Một phương án đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư thể rắn bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của tác nhân đã sàng lọc để điều trị bệnh ung thư thể rắn cho bệnh nhân cần điều trị bệnh ung thư thể rắn. Theo một phương án, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn bao gồm tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư được sàng lọc như trên. Một phương án đề xuất phương pháp ức chế tế bào gốc ung thư, ví dụ, tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu được phẩm của tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư như trên cho bệnh nhân bị bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư thể rắn bệnh nhân. Theo một phương án, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD43 mới hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể liên kết với epitop được định vị trong miền ngoại bào của CD43. Epitop có thể là polypeptit bao gồm từ 6 đến 9 axit amin liên tiếp trong miền ngoại bào của CD43 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là kháng thể có nguồn gốc từ động vật (ví dụ, kháng thể chuột nhắt), kháng thể khảm, hoặc kháng thể được nhân hóa, và có thể là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng, và nó có thể được sản xuất không tự nhiên (ví dụ, sự tổng hợp hóa học hoặc sinh học, phương pháp tái tổ hợp, v.v.).

Vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) thứ nhất (CDR1H), CDR thứ hai (CDR2H) và CDR thứ ba (CDR3H), theo thứ tự từ đầu cuối N đến đầu cuối C.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng

nguyên của nó có thể bao gồm CDR1H bao gồm trình tự axit amin GYX₁MN (SEQ ID NO: 110; X₁ có thể được chọn từ tất cả các axit amin, và ví dụ, có thể là F hoặc Y) (ví dụ, GYFMN (SEQ ID NO: 111) hoặc GYYMN (SEQ ID NO: 112)), CDR2H bao gồm trình tự axit amin RINPNX₂GDSFYNQKFX₃G (SEQ ID NO: 113; X₂ và X₃ có thể được chọn từ tất cả các axit amin một cách tương ứng, và ví dụ, X₂ có thể là N hoặc S, và X₃ có thể là Q hoặc K) (ví dụ, RINPNNGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 114), RINPNSGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 115), RINPNNGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 116), hoặc RINPNSGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 117)), và CDR3H bao gồm trình tự axit amin EGYYGGRGYALDY (SEQ ID NO: 118) là thành phần thiết yếu của vùng biến đổi chuỗi nặng.

Vùng biến đổi chuỗi nặng còn có thể bao gồm khung của globulin miễn dịch ở đầu cuối N và/hoặc đầu cuối C của vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) được đề cập ở trên. Cụ thể hơn, vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm khung thứ nhất (FR1H), vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) thứ nhất (CDR1H), khung thứ hai (FR2H), CDR thứ hai (CDR2H), khung thứ ba (FR3H), CDR thứ ba (CDR3H), và khung thứ tư (FR4H) theo thứ tự từ đầu cuối N đến đầu cuối C.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được nhân hóa, và

(i) FR1H có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 30 của một trong số SEQ ID NO: 83 đến SEQ ID NO: 94, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin ở trên;

(ii) CDR1H có thể bao gồm trình tự axit amin GYX₁MN (SEQ ID NO: 110; X₁ có thể được chọn trong số tất cả các axit amin, và ví dụ, có thể là F hoặc Y), và ví dụ, có thể bao gồm trình tự axit amin GYFMN (SEQ ID NO: 111) hoặc GYYMN (SEQ ID NO: 112);

(iii) FR2H có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 36 đến số 49 trong số một trong số SEQ ID NO: 83 đến SEQ ID NO: 94, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc

lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin nêu trên;

(iv) CDR2H có thể bao gồm trình tự axit amin RINPNX₂GDSFYNQKFX₃G (SEQ ID NO: 113; mỗi trong số X₂ và X₃ có thể là độc lập được chọn từ tất cả các axit amin, và ví dụ, X₂ có thể là N hoặc S, X₃ có thể là Q hoặc K), và ví dụ, có thể bao gồm trình tự axit amin RINPNNGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 114), RINPNSGDSFYNQKFQG (SEQ ID NO: 115), RINPNNGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 116), hoặc RINPNSGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 117);

(v) FR3H có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 67 đến số 98 trong số một trong số SEQ ID NO: 83 đến SEQ ID NO: 94, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin nêu trên;

(vi) CDR3H có thể bao gồm trình tự axit amin EGYYGGRGYALDY (SEQ ID NO: 118);

(vii) FR4H có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 112 đến số 122 trong số một trong số SEQ ID NO: 83 đến SEQ ID NO: 94, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể bao gồm CDR thứ nhất (CDR1L), CDR thứ hai (CDR2L) và CDR thứ ba (CDR3L), theo thứ tự từ đầu cuối N đến đầu cuối C.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm CDR1L bao gồm trình tự axit amin RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 119); CDR2L bao gồm trình tự axit amin X₄TX₅RLHS (SEQ ID NO: 120; X₄ và X₅ có thể được chọn từ tất cả các axit amin một cách tương ứng, và ví dụ,

X₄ có thể là N, Q hoặc A, và X₅ có thể là S hoặc A) (ví dụ, NTSRLHS (SEQ ID NO: 121, NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), hoặc ATSLRLHS (SEQ ID NO: 124)); và CDR3L bao gồm trình tự axit amin QQSNMFPY (SEQ ID NO: 125) là thành phần thiết yếu của vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ còn có thể bao gồm khung của globulin miễn dịch ở đầu cuối N và/hoặc đầu cuối C của vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) được đề cập ở trên. Cụ thể hơn, vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể bao gồm khung thứ nhất (FR1L), vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) thứ nhất (CDR1 L), khung thứ hai (FR2 L), CDR thứ hai (CDR2 L), khung thứ ba (FR3 L), CDR thứ ba (CDR3 L), và khung thứ tư (FR4 L) theo thứ tự từ đầu cuối N đến đầu cuối C.

Theo một phương án cụ thể,

(viii) FR1L có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 23 trong số một trong số SEQ ID NO: 95 đến SEQ ID NO: 109, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin ở trên;

(ix) CDR1L có thể bao gồm trình tự axit amin RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 119);

(x) FR2L có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 35 đến số 49 trong số một trong số SEQ ID NO: 95 đến SEQ ID NO: 109, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin ở trên;

(xi) CDR2L có thể bao gồm trình tự axit amin X₄TX₅RLHS (SEQ ID NO: 120; mỗi trong số X₄ và X₅ có thể là độc lập được chọn từ tất cả các axit amin, và, ví dụ, X₄ có thể là N, Q, hoặc A, và X₅ có thể là S hoặc A), và ví dụ, có thể bao gồm NTSRLHS (SEQ ID NO: 121, NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), hoặc ATSLRLHS ((SEQ ID NO: 124).

(xii) FR3L có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 57 đến số 88 trong số một trong số SEQ ID NO: 95 đến SEQ ID NO: 109, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin ở trên.

(xiii) CDR3L có thể bao gồm trình tự axit amin QQSNMFPY (SEQ ID NO: 125);

(xiv) FR4L có thể bao gồm trình tự axit amin từ số 97 đến số 108 trong số một trong số SEQ ID NO: 95 đến SEQ ID NO: 109, hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin nêu trên.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, hoặc 94. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, hoặc 109.

Ví dụ, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được nhân hóa, và có thể được minh họa là bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được xác định như sau:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 83 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 95;

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96;

(c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97;

(d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98;

(e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99;

(f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;

(g) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 89 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101;

(h) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 102;

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103;

(j) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103;

(k) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106;

(l) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97;

(m) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103;

(n) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 107;

(o) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 108;

hoặc

(p) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 109.

Một phương án cụ thể, trình tự axit amin của khung được bao gồm trong kháng thể kháng CD43 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được minh họa như sau, nhưng không giới hạn ở đó:

(i) FR1H có thể bao gồm gốc axit amin từ số 1 đến số 30 của một trong số SEQ ID NO: 83 đến 94;

(ii) FR2H có thể bao gồm gốc axit amin từ số 36 đến số 49 của một trong số SEQ ID NO: 83 đến 94;

(iii) FR3H có thể bao gồm gốc axit amin từ số 67 đến số 98 của một trong số SEQ ID NO: 83 đến 94;

(iv) FR4H có thể bao gồm gốc axit amin từ số 112 đến số 122 của một trong số SEQ ID NO: 83 đến 94;

(v) FR1L có thể bao gồm gốc axit amin từ số 1 đến số 23 của một trong số SEQ ID NO: 95 đến 109;

(vi) FR2L có thể bao gồm gốc axit amin từ số 35 đến số 49 của một trong số SEQ ID NO: 95 đến 109;

(vii) FR3L có thể bao gồm gốc axit amin từ số 57 đến số 88 của một trong số SEQ ID NO: 95 đến 109;

(viii) FR4L có thể bao gồm gốc axit amin từ số 97 đến số 108 của một trong số SEQ ID NO: 95 đến 109.

Trong một ví dụ khác, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn có thể bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng ở người và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ ở người được tạo ra từ globulin miễn dịch ở người. Globulin miễn dịch ở người có thể được chọn từ nhóm gồm IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, v.v.. Ví dụ, vùng hằng định chuỗi nặng ở người có thể bao gồm trình tự axit amin số 123-452 nêu trong SEQ ID NO: 40 hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin ở trên; và vùng hằng định chuỗi nhẹ ở người có thể bao gồm trình tự axit amin số 108-214 nêu trong SEQ ID NO: 48 hoặc trình tự axit amin có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc

lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, 99,9% hoặc lớn hơn, trình tự tương đồng với trình tự axit amin ở trên.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể khác biệt ở chỗ gốc axit amin không được glycosyl hóa. Đối với điều này, khi môtip được glycosyl hóa, ví dụ, môtip N-glycosyl hóa (ví dụ, “N-X-S/T” (X có thể là tất cả các gốc axit amin)) là trong kháng thể, cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ, môtip có thể được cải biến. Ví dụ, khi môtip N-glycosyl hóa là “N-X-S/T” (X có thể là tất cả các gốc axit amin), “N”, “S/T” hoặc cả hai trong số chúng trong môtip có thể được thay thế bằng axit amin khác với ban đầu, một cách tương ứng. Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 không được glycosyl hóa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm NTARLHS (SEQ ID NO: 122), QTSRLHS (SEQ ID NO: 123), hoặc ATSRLHS (SEQ ID NO: 124) là CDR2L. Theo một phương án khác, kháng thể kháng CD43 không được glycosyl hóa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 107, 108, hoặc 109 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cụ thể liên kết với epitop đặc trưng được đề cập ở trên của CD43, và có thể được chọn từ nhóm gồm kháng thể động vật (ví dụ, kháng thể chuột nhắt), kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa và mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Kháng thể động vật có thể thu được từ các loài động vật khác với người, và ví dụ, có thể thu được từ chuột cống, chuột nhắt, dê, chuột lang, lừa, thỏ, ngựa, lạc đà không bướu, lạc đà, chim (ví dụ, gà, vịt, v.v.), và v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Kỹ thuật để cấu trúc kháng thể khảm và/hoặc kháng thể được nhân hóa từ kháng thể động vật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Kháng thể được nhân hóa có thể là IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE hoặc isotyp thích hợp bất kỳ như phân lớp bất kỳ.

Ở đây, liên kết đặc hiệu với CD43 của kháng thể có thể có nghĩa là kháng thể có ái lực cao hơn với CD43 so với peptit không phải CD43, hoặc có ái lực cao hơn với epitop được đề cập ở trên của CD43 so với vùng khác của CD43 hoặc vùng ngoại bào khác.

Liên kết của kháng thể và kháng nguyên (cụ thể hơn, epitop) (liên kết kháng nguyên-kháng thể) có thể được đo bằng tất cả các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, liên kết kháng nguyên-kháng thể có thể được đo bằng một hoặc nhiều loại phương pháp được chọn từ nhóm gồm ELISA, đếm tế bào theo dòng chảy, nhuộm hóa miễn dịch, cảm biến sinh học quang học BIAcore, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Thuật ngữ đoạn (mảnh) liên kết kháng nguyên được sử dụng ở đây có nghĩa là một phần (mảnh) của kháng thể có khả năng nhận diện đặc hiệu kháng nguyên (CD43) hoặc epitop được đề cập ở trên của CD43 và/hoặc liên kết đặc hiệu với nó. Ví dụ, đoạn liên kết kháng nguyên có thể được chọn từ nhóm gồm các mảnh Fab, F(ab)2, Fv, scFv, scFv-Fc, v.v..

Theo một phương án, epitop của kháng CD43 có thể là scFv kháng CD43. ScFv kháng CD43 có thể bao gồm CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, và CDRL3 được đề cập ở trên, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được đề cập ở trên.

Đối với scFv kháng CD43, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được đề cập ở trên có thể được liên kết bằng một tác nhân liên kết thích hợp. Tác nhân liên kết này có thể là tác nhân liên kết peptit gồm từ 1 đến 100 hoặc từ 2 đến 50 axit amin bất kỳ, và trình tự thích hợp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit có thể được biểu hiện dưới dạng GGGX₆S (X₆ là G hoặc A; SEQ ID NO: 126) hoặc (GGGX₆S)_n (n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5, và X₆ được bao gồm trong mỗi đơn vị lặp lại độc lập là G hoặc A), và ví dụ, có thể bao gồm trình tự axit amin GGGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 127) hoặc GGGGSGGGGSGGGAS (SEQ ID NO: 128), nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án, scFv kháng CD43 có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50, 52, 54, 56, hoặc 58, nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể thể hiện tính gây độc tế bào đối với tế bào đích được liên hợp với vật liệu gây độc tế bào mà có thể gây ra sự chết tế bào (ví dụ, bao gồm sự gây

chết tế bào theo chương trình như cơ chế gây chết tế bào theo chương trình). Vật liệu gây độc tế bào có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm tất cả các hợp chất (hợp chất phân tử nhỏ; tác nhân điều trị bệnh ung thư, v.v.), protein, peptit, oligonucleotit, polynucleotit, v.v., đã biết thể hiện độc tính đối với tế bào, cụ thể là, tế bào ung thư trong lĩnh vực kỹ thuật, và ví dụ, có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm chất đồng vị phóng xạ, hợp chất gây độc tế bào (phân tử nhỏ), protein gây độc tế bào, tác nhân điều trị bệnh ung thư, v.v.. Protein gây độc tế bào có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm rixin, saporin, gelonin, momordin, debouganin, độc tố bạch hầu, độc tố pseudomonas, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Chất đồng vị phóng xạ có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm ^{131}I , ^{188}Rh , ^{90}Y , v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Hợp chất gây độc tế bào có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm duocarmyxin, monomethyl auristatin E (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF), N2'-deaxetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)maytansin (DM1), PBD (Pyrolobenzodiazepin) dime, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được tạo ra dưới dạng thể liên hợp trong đó chỉ thị có thể phát hiện được liên hợp. Thể liên hợp có thể là thường được sử dụng để phát hiện sự có mặt của CD43 hoặc epitop được đề cập ở trên của CD43 *in vitro* hoặc *in vivo*. Chỉ thị có thể phát hiện có thể được chọn từ tất cả các vật liệu chỉ thị thường được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và ví dụ, có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm chỉ thị phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm , v.v.), enzym, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu từ, vật liệu hóa học như biotin, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Để lựa chọn chất đánh dấu thích hợp theo việc sử dụng kháng thể hoặc epitop là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Một phương án đề xuất được phẩm để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm hoạt chất. Một phương án đề xuất được phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư chứa kháng

thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm hoạt chất. Một phương án đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu dược phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng cần ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư. Một phương án đề xuất phương pháp ức chế tế bào gốc ung thư, bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu dược phẩm của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng cần ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư. Lượng hữu hiệu dược phẩm có nghĩa là lượng hữu hiệu để thu được tác dụng chống ung thư mong muốn, ví dụ, tác dụng điều trị bệnh (ví dụ, làm tăng sự chết tế bào của tế bào ung thư, làm giảm các mô ung thư, ức chế sự di căn của bệnh ung thư, v.v.) ở đối tượng được dùng. Đối với dược phẩm và phương pháp, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được dùng một mình hoặc ở dạng thể liên hợp được liên kết với vật liệu gây độc tế bào. Vật liệu gây độc tế bào là tương tự như được mô tả ở trên.

Bệnh ung thư có thể đặc hiệu đối với tất cả bệnh ung thư biểu hiện epitop được đề cập ở trên của CD43. Theo một phương án, bệnh ung thư có thể là bệnh máu ác tính, và ví dụ, có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính, u lympho Hodgkin, u lympho không phải Hodgkin, v.v.. Theo một phương án khác, bệnh ung thư có thể là một hoặc nhiều loại được chọn trong số các bệnh ung thư thể rắn được đề cập ở trên.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được dùng với lượng đủ để liên kết với CD43 trên bề mặt tế bào, cụ thể là, epitop của CD43 hoặc CD43 được đề cập ở trên trên tế bào khối u biểu hiện epitop của CD43, và lượng này có thể được xác định mà không gây khó khăn với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Lượng hữu hiệu dược phẩm được đề cập ở trên hoặc lượng đầy đủ có nghĩa là lượng tạo ra tác dụng mong đợi cho đối tượng được dùng. Tác dụng mong đợi này sẽ kèm theo liên kết của kháng thể với CD43 (hoặc epitop của CD43) được biểu hiện trên bề mặt tế bào, và liên kết này có thể là thể hiện tính gây độc tế bào (ví dụ, tính

gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)) thông qua kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên hoặc vật liệu gây độc tế bào được liên hợp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Theo một phương án khác, tác dụng mong đợi là cảm ứng sự liên kết của kháng thể với CD43 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào với một ít hoặc không có tính gây độc tế bào bởi các kháng thể khác, và nhờ đó liên kết này có thể giúp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này phát hiện và loại bỏ chọn lọc (ví dụ, gạn bạch cầu) từ các tế bào CD43+ và các tế bào CD43+ ở bệnh nhân (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được đánh dấu bằng chỉ thị có thể phát hiện). Lượng phân tử kháng thể cần đến có thể khác nhau phụ thuộc vào bệnh nhân, giới tính, độ tuổi và tình trạng bệnh lý chung của bệnh nhân, việc dùng hợp chất cụ thể, phương pháp dùng, v.v., ở bệnh nhân. Do đó, nó không thể chỉ định là “lượng đầy đủ chính xác”. Tuy nhiên, trong trường hợp cụ thể bất kỳ, lượng thích hợp có thể được xác định bằng kỹ thuật thông thường bằng cách sử dụng thử nghiệm thông thường. Ngoài ra, liều lượng này có thể được điều chỉnh theo tính khẩn cấp của tình huống và có thể được điều chỉnh để suy ra liều lượng tối ưu. Ví dụ, các liều lượng khác nhau có thể được dùng hằng ngày, hằng tuần, hằng tháng hoặc trong khoảng thời gian thích hợp khác.

Lượng hữu hiệu được phẩm được đề cập ở trên hoặc lượng đầy đủ có thể được xác định bằng cách kiểm tra kháng thể liên kết với tế bào trong mẫu sinh học (ví dụ, mẫu dịch thể (ví dụ, mẫu máu, v.v.), mẫu tế bào/mô (ví dụ, mẫu tế bào/mô của khối u, v.v.), và v.v., thu được từ bệnh nhân mà dùng hoặc được cho dùng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Mẫu sinh học có thể được thu từ bệnh nhân tại thời điểm cụ thể sau khi dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể (ví dụ, khoảng 5, 10, 15 hoặc 20 phút sau khi dùng). Sự có mặt của kháng thể hoặc mảnh kháng thể trên bề mặt tế bào trong mẫu (tức là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được liên kết với CD43 hoặc epitop của nó trên bề mặt tế bào bằng phản ứng kháng nguyên - kháng thể) có thể được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, mẫu sinh học thu được có thể được sử dụng đối với phép phân tích chung để đo khả năng sống sót của tế bào hoặc số lượng tế bào sống trong mẫu. Dựa trên thực tế rằng số lượng tế bào dương tính với

CD43 bị giảm đi sau khi dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể (ví dụ, giảm số lượng tế bào sống trong mẫu trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể được dùng, so với mẫu đối chứng tương tự mẫu thu được trước khi dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, v.v.), tính gây độc tế bào qua trung gian kháng thể có thể được đo. Tính gây độc tế bào có thể có trung gian bởi một mình kháng thể (ví dụ, kháng thể không được liên hợp không giống với vật liệu gây độc tế bào hoặc mảnh liên kết kháng nguyên) và/hoặc có thể có trung gian bởi vật liệu gây độc tế bào được liên hợp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với epitop của CD43 được đề xuất ở đây có thể làm giảm 10% hoặc lớn hơn, 20% hoặc lớn hơn, 30% hoặc lớn hơn, 40% hoặc lớn hơn, 50% hoặc lớn hơn, 60% hoặc lớn hơn, 70% hoặc lớn hơn, 80% hoặc lớn hơn hoặc 90% hoặc lớn hơn, mức tế bào dương tính với CD43 đích trong mẫu bệnh nhân được dùng, so với mức tế bào dương tính với CD43 trong mẫu đối chứng (ví dụ, mẫu thu được từ bệnh nhân trước khi dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể). Theo một phương án, tế bào dương tính với CD43 có thể là tế bào ung thư, ví dụ, tế bào tạo máu ác tính (ví dụ, tế bào bệnh bạch cầu), và/hoặc tế bào gốc ung thư.

Theo một phương án khác, liều lượng (lượng hữu hiệu được phẩm) của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được đánh giá và được xác định bằng thử nghiệm dựa trên tế bào *in vitro*. Ví dụ, để xác định nồng độ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể để làm giảm số lượng tế bào dương tính với CD43 mà là đích của kháng thể hoặc mảnh kháng thể, thử nghiệm dựa trên tế bào *in vitro* sử dụng tế bào dương tính với CD43 (ví dụ, dòng tế bào CEM7) có thể được tiến hành. Nồng độ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể được xác định để làm giảm số lượng của các tế bào *in vitro* (ví dụ, làm giảm ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90%, so với số lượng tế bào khi kháng thể hoặc mảnh kháng thể không có mặt) có thể được chấp nhận là cơ sở để xác định liều lượng đủ để làm giảm số lượng tế bào dương tính với CD43 được cần đến *in vivo*. Ngoài ra, liều lượng có thể được xác định khi xem xét các yếu tố như cân nặng của bệnh nhân, thể tích máu, tốc độ thanh thải, v.v..

Thuật ngữ, “đối tượng hoặc bệnh nhân” được sử dụng ở đây có thể được chọn trong số các động vật bao gồm động vật có vú giống người, khỉ đột, tinh tinh, v.v., hoặc có thể là tế bào, mô, dịch thể được phân lập từ động vật hoặc môi trường nuôi của chúng. Động vật có vú có thể bao gồm người. Sáng chế được đề xuất ở đây có thể được áp dụng để hướng đích đặc hiệu tế bào dương tính với CD43 trong lĩnh vực dùng cho người hoặc thú y, và sáng chế có nội dung rõ ràng có thể hiểu được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, “động vật” được sử dụng không chỉ chung cho động vật linh trưởng giống người, khỉ, v.v., mà còn cả vật nuôi và vật cưng như bò, ngựa, cừu, lợn, lạc đà, dê, lừa, chó, mèo, v.v., và động vật thí nghiệm như chuột nhắt, chuột cống, v.v.. Trong trường hợp ngựa, ngựa được sử dụng trong môn thể thao đua cũng như ngành giải trí hoặc vật nuôi.

Khi cần, phương pháp được đề xuất ở đây còn có thể bao gồm bước tiến hành các phương pháp điều trị bệnh thứ hai (ví dụ, tác nhân trị liệu). Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước dùng hợp chất hóa trị khác (hoạt chất thứ hai) cho đối tượng cần điều trị. Việc dùng hoạt chất thứ hai có thể được tiến hành đồng thời với việc dùng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được tạo ra ở đây, hoặc có thể được tiến hành theo thứ tự bất kỳ (trước hoặc sau khi dùng kháng thể, v.v.).

Theo một khía cạnh khác, ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư; việc tạo ra tác nhân điều trị bệnh ung thư; sự ức chế tế bào gốc ung thư; và/hoặc tạo ra tác nhân ức chế tế bào gốc ung thư của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây.

Đối với dược phẩm, phương pháp và cách sử dụng được bộc lộ ở đây, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư thể rắn hoặc bệnh ung thư máu, và có thể là bệnh ung thư tiên phát hoặc bệnh ung thư di căn. Theo một phương án, bệnh ung thư có thể là bệnh máu ác tính. Bệnh máu ác tính có thể là bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính hoặc u lympho Hodgkin, nhưng không giới hạn ở đó. Bệnh máu ác tính có thể là bệnh ung thư bao gồm tế bào gốc ung thư.

Theo một phương án khác, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư thể rắn. Bệnh ung thư thể rắn có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư phổi (ví dụ, caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tuyến ở phổi, caxinom tế bào vảy ở phổi), bệnh ung thư màng bụng, bệnh ung thư da, u hắc sắc tố trong da hoặc nhân cầu, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư gần hậu môn, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư tuyến nội tiết, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacôm mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư ruột già, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư màng trong dạ con, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, sacôm xương, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Ví dụ, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư ruột già, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, hoặc bệnh ung thư bàng quang. Bệnh ung thư này không chỉ bao gồm bệnh ung thư tiên phát mà còn bao gồm bệnh ung thư di căn. Ngoài ra, bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư có tính kháng với các tác nhân điều trị bệnh ung thư thông thường (ví dụ, tác nhân điều trị bệnh ung thư phân tử nhỏ (hóa chất chống ung thư), chất chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, thuốc kháng sinh, vinca alkaloid, enzym, hoóc môn, tác nhân trị liệu đích, và/hoặc tác nhân trị liệu là kháng thể, v.v.), và có thể là bệnh ung thư tái phát sau khi điều trị các tác nhân điều trị bệnh ung thư thông thường (ví dụ, tác nhân điều trị bệnh ung thư phân tử nhỏ (hóa chất chống ung thư), chất chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, thuốc kháng sinh, vinca alkaloid, enzym, hoóc môn, tác nhân trị liệu đích, và/hoặc tác nhân trị liệu là kháng thể, v.v.). Bệnh ung thư thể rắn có thể là bệnh ung thư bao gồm tế bào gốc ung thư.

Tác dụng của việc điều trị bệnh ung thư thể rắn không chỉ bao gồm sự ức

chế sinh trưởng (sự giảm định lượng) và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của tế bào ung thư (cụ thể là, tế bào gốc ung thư) hoặc mô ung thư chứa chúng, mà còn bao gồm tác dụng ức chế tình trạng trở nên xấu hơn của bệnh ung thư bằng cách ức chế sự di trú, xâm lấn, di căn, v.v..

Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây có thể được dùng qua các đường dùng khác nhau, và có thể được dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, về các ví dụ thích hợp của đường dùng, là tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong động mạch, tiêm trong cơ hoặc truyền, v.v., và theo một phương án, nó có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được bào chế ở dạng được dùng một mình hoặc cùng với hợp chất trị liệu thứ hai (ví dụ, hợp chất hóa trị).

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây và một hoặc nhiều loại chất phụ gia được chọn từ nhóm gồm chất mang, chất pha loãng và tá dược được dùng được đề xuất. Theo một phương án, kháng thể được bao gồm trong dược phẩm có thể bao gồm dạng trong đó vật liệu gây độc tế bào được liên kết hoặc được liên hợp. Chất mang, chất pha loãng và tá dược được dùng thích hợp đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và như được lấy làm ví dụ, là dung dịch nước muối, dung môi (ví dụ, dung môi tiêm), môi trường phân tán, tác nhân kháng nấm và/hoặc kháng khuẩn, chất hoạt động bề mặt, tác nhân đẳng trương, chất hấp phụ, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án, dược phẩm có thể được bào chế dưới các dạng khác nhau của chế phẩm như trong các dạng liều đơn vị khác nhau của chế phẩm có thể tiêm, v.v..

Việc bào chế và việc dùng tiếp theo dược phẩm có thể là theo các kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật. Việc dùng phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý của đối tượng đối với việc điều trị, tính phản ứng với thuốc, v.v., nhưng mong muốn được tiếp tục nếu tác dụng mong muốn kéo dài. Liều lượng, phương pháp dùng và

tần suất lặp lại của được phẩm có thể được xác định có xem xét về độ tuổi, giới tính, tình trạng bệnh tật, tính phản ứng với thuốc, v.v., và điều này là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Một phương án của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Phương pháp điều chế này có thể bao gồm bước biểu hiện phân tử axit nucleic trong tế bào chủ. Bước biểu hiện này có thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào tái tổ hợp, và tùy ý, có thể còn bao gồm bước phân lập và/hoặc tinh chế kháng thể từ môi trường nuôi cấy tế bào thu được.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp tạo ra, có thể bao gồm:

bước nuôi cấy tế bào tái tổ hợp được biến nạp với axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc vector tái tổ hợp chứa chúng trong điều kiện và/hoặc khoảng thời gian đủ để biểu hiện axit nucleic; và

bước phân lập và/hoặc tinh chế kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ tế bào được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy thu được.

Tế bào tái tổ hợp có thể thu được bằng cách biến nạp tế bào chủ với axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc vector tái tổ hợp chứa nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD43 đã tinh chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thu được từ bước phân lập và/hoặc tinh chế. Kháng thể thu được hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể là phân tử tái tổ hợp được phân lập từ các thành phần khác được liên kết khi được biểu hiện trong tế bào hoặc được bài tiết ra ngoài tế bào. Theo một phương án, kháng thể được phân lập và/hoặc được tinh chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể có độ tinh khiết bằng 50% hoặc lớn hơn, 60% hoặc lớn hơn, 70% hoặc lớn hơn, 75% hoặc lớn hơn, 80% hoặc lớn hơn, 85% hoặc lớn hơn, 90% hoặc lớn hơn, 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, hoặc 99% hoặc lớn hơn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu rõ rằng mức độ phân lập và/hoặc tinh chế phụ thuộc vào mục đích sử dụng và/hoặc dạng sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên. Ví dụ, khi được dự định được dùng cho động vật, cụ thể là, trong cơ thể người, độ tinh khiết tinh chế của kháng thể hoặc mảnh

liên kết kháng nguyên có thể được yêu cầu ở mức tương đối cao, và khi được sử dụng cho các thử nghiệm in vitro, các tạp chất có thể chấp nhận (ví dụ, các thành phần có nguồn gốc từ tế bào chủ và/hoặc môi trường nuôi cấy (protein, v.v.) và v.v.) có thể được bao gồm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một phương án cụ thể, axit nucleic có thể bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (miền liên kết VH) của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (miền liên kết VL), hoặc các dạng kết hợp của chúng. Phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, và 29. Phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, và 31.

Axit nucleic có thể được bao gồm trong vector biểu hiện thích hợp. Vector biểu hiện có thể là tất cả các vector thường được sử dụng để biểu hiện gen ngoại lai trong tế bào chủ, và ví dụ, có thể được minh họa dưới dạng pTT5, pAPEX3p, pcDNA3.2(-), v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc vector tái tổ hợp chứa chúng (hoặc vector biểu hiện). Tế bào tái tổ hợp thu được bằng cách đưa phân tử axit nucleic hoặc vector tái tổ hợp vào tế bào chủ, và tế bào này có thể biểu hiện phân tử axit nucleic. Ví dụ về tế bào chủ là tế bào không có nhân điển hình (ví dụ, *E. Coli*, v.v.) hoặc tế bào động vật nguyên sinh, và tế bào nhân chuẩn (có nhân điển hình) như tế bào động vật (ví dụ, tế bào CHO, COS, HEK-293E, HEK-293T, gen đặc hiệu được cải biến (ví dụ, tế bào được loại bỏ của nó, v.v.), tế bào thực vật, tế bào nấm (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*, v.v.), tế bào côn trùng (ví dụ, tế bào Sf9, v.v.), nhưng không giới hạn ở đó, và có thể được chọn trong số tất cả các tế bào mà có thể biểu hiện gen ngoại lai.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện CD43

hoặc phương pháp phát hiện tế bào dương tính với CD43, bao gồm bước cho kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tiếp xúc với mẫu tế bào và bước xác nhận xem liệu liên kết kháng nguyên-kháng thể có ở trong mẫu này không. Bằng phương pháp này, liệu CD43 có được biểu hiện trên bề mặt tế bào trong mẫu tế bào này có thể được xác nhận không, và do đó, phương pháp này có thể được áp dụng để chẩn đoán bệnh liên quan đến sự biểu hiện của CD43. Do đó, một phương án đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh có liên quan đến CD43 hoặc phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán các bệnh liên quan đến CD43, bao gồm bước cho kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tiếp xúc với mẫu tế bào và bước xác nhận xem liệu liên kết kháng nguyên-kháng thể có ở trong mẫu này không. Bệnh liên quan đến CD43 là bệnh liên quan đến sự có mặt của CD43 hoặc sự tăng lên của CD43, và có thể là bệnh ung thư, và bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư thể rắn hoặc bệnh máu ác tính, và cụ thể, có thể là bệnh máu ác tính liên quan đến sự tăng lên của CD43 (ví dụ, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính). Theo phương án cụ thể khác, bệnh có liên quan đến CD43 có thể là bệnh ung thư bao gồm tế bào gốc ung thư.

Trong phương pháp này, liên kết kháng nguyên-kháng thể có thể được xác nhận bằng cách phát hiện xem liệu có phức hợp giữa kháng thể (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) và các dạng protein CD43 (tức là, khi sự hình thành phức hợp của kháng thể-protein CD43 được phát hiện, xác nhận được rằng có mặt liên kết kháng nguyên-kháng thể). Sau đó, đối với sự so sánh tương đối, có thể được so sánh với kết quả thu được từ mẫu tế bào thử nghiệm bằng cách tiến hành cùng thử nghiệm đối với mẫu tế bào đối chứng. Mẫu tế bào đối chứng có thể được chọn trong số tế bào âm tính với CD43 đã được biết rõ, hoặc tế bào bình thường (các tế bào không phải ung thư hoặc các tế bào không phải khối u).

Theo một phương án, phương pháp phát hiện hoặc phương pháp chẩn đoán, có thể bao gồm:

- (1) bước cho kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên tiếp xúc với mẫu tế bào thử nghiệm và mẫu tế bào đối chứng; và
- (2) bước đo xem liệu có sự hình thành phức hợp giữa kháng thể hoặc mảnh

liên kết kháng nguyên và tế bào hoặc mức của nó. Sau đó, khi có mặt phức hợp trong mẫu tế bào thử nghiệm hoặc mức tương đối cao của phức hợp so với mẫu tế bào đối chứng được đo, có thể được xác nhận rằng CD43 có mặt trong mẫu tế bào thử nghiệm hoặc tế bào là tế bào biểu hiện CD43 (tức là, tế bào dương tính với CD43). Mẫu tế bào này có thể được phân lập từ cơ thể sống, và phương pháp có thể được tiến hành *in vitro*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để phát hiện hoặc hiển thị (mô tả bằng hình ảnh) CD43 chứa kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Một phương án đề xuất phương pháp phát hiện hoặc hiển thị (mô tả bằng hình ảnh) CD43 bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Chế phẩm và phương pháp này có thể được ứng dụng để phát hiện và/hoặc hiển thị CD43 *in vivo* cũng như *in vitro*. Đối với chế phẩm và phương pháp này, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể là dạng được liên hợp với chất đánh dấu có thể phát hiện, và ví dụ, chất đánh dấu có thể phát hiện có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm chất đánh dấu phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm , v.v.), enzym, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu từ, vật liệu hóa học giống biotin, v.v., nhưng không giới hạn ở đó, và có thể là tất cả các chất đánh dấu có thể phát hiện được bằng các phương pháp phát hiện thông thường được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Như được mô tả ở trên, sự phát hiện và/hoặc hiển thị CD43 *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được sử dụng để chẩn đoán các bệnh liên quan đến sự tăng số lượng của tế bào dương tính với CD43, ví dụ, bệnh ung thư, cụ thể hơn là bệnh ung thư hoặc bệnh máu ác tính chứa tế bào gốc ung thư.

Phương pháp phát hiện và/hoặc hiển thị CD43 (*in vivo*) có thể bao gồm các bước sau đây:

(i) bước dùng kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng thử nghiệm; và

(ii) bước đo sự hình thành phức hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc mức độ (mức) hình thành phức hợp.

Phức hợp có thể là phức hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và CD43 được biểu hiện trên bề mặt tế bào trong cơ thể của đối tượng thử nghiệm hoặc phức hợp được tạo ra bằng liên kết kháng nguyên-kháng thể giữa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và tế bào biểu hiện CD43 (tế bào dương tính với CD43). Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng ở dạng được liên hợp với chất đánh dấu có thể phát hiện được đề cập ở trên. Phương pháp hiển thị có thể được ứng dụng để hiển thị tế bào biểu hiện CD43, ví dụ, tế bào gốc ung thư.

Liệu phức hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có được tạo ra trong đối tượng dùng hay không hoặc mức tạo thành có thể được đánh giá tương đối bằng cách so sánh xem liệu phức hợp này có được tạo thành trong đối tượng đối chứng không (ví dụ, đối tượng không bị bệnh có liên quan đến CD43 hoặc đối tượng không chứa tế bào biểu hiện quá mức CD43) hoặc mức tạo thành. Đối với việc so sánh này, phương pháp này có thể bao gồm,

(i-1) bước dùng kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng thử nghiệm hoặc đối tượng đối chứng, một cách tương ứng;

(ii-1) bước đo xem liệu phức hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được tạo thành hoặc mức độ (mức) tạo thành trong đối tượng thử nghiệm và đối tượng đối chứng, một cách tương ứng; và

(iii) bước so sánh kết quả được đo trong đối tượng thử nghiệm với kết quả trong đối tượng đối chứng.

Phương pháp này có thể được ứng dụng để chẩn đoán bệnh liên quan đến CD43 của đối tượng thử nghiệm hoặc xác nhận (phát hiện) tế bào gốc ung thư biểu hiện CD43. Trong trường hợp này, khi tạo thành phức hợp hoặc sự tăng cao mức tạo thành phức hợp so với đối tượng đối chứng trong bước (ii) hoặc (ii-1) được đo, đối tượng thử nghiệm có thể được xác định là bệnh nhân bị bệnh liên quan đến CD43 hoặc có thể được xác định rằng đối tượng thử nghiệm có tế bào gốc ung thư.

Sự tạo thành phức hợp kháng nguyên (hoặc tế bào biểu hiện kháng nguyên trên bề mặt)-kháng thể in vivo hoặc in vitro có thể được đo bằng các phương pháp phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật, và các phương pháp phổ biến này là rõ ràng đối

với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phức hợp có thể được xác nhận bằng cách đánh dấu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên với chất đánh dấu có thể phát hiện thích hợp và đo tín hiệu của chất đánh dấu hoặc bằng các phương pháp phát hiện thích hợp. Phương pháp phát hiện thích hợp này có thể là tất cả các phương pháp phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật, và ví dụ, có thể là ELISA, hệ thống đếm tế bào theo dòng chảy được hoạt hóa (FACS), kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch, v.v., nhưng không giới hạn ở các phương pháp đó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng các thay đổi và/hoặc cải biến khác đối với sáng chế được đề xuất ở đây khác với các thay đổi và/hoặc cải biến được mô tả ở trên có thể được tạo ra. Sáng chế được đề xuất ở đây nên được hiểu là bao gồm tất cả các thay đổi và/hoặc cải biến nằm trong phạm vi đã được bộc lộ. Ngoài ra, sáng chế được đề xuất ở đây có thể bao gồm toàn bộ hoặc một cách tương ứng tất cả các bước, các đặc trưng, chế phẩm và/hoặc hợp chất được mô tả hoặc đề cập rõ ràng ở đây.

Các phương án cụ thể sẽ được mô tả bằng cách viện dẫn đến phương án sau đây, nhưng các ví dụ này được nêu ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và không làm giới hạn phạm vi được đề cập ở trên của sáng chế.

Hiểu rằng trình tự nucleotit được phát triển và được mô tả ở đây được cải biến bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, sự thuần thực ái lực hoặc phương pháp làm giảm tính gây miễn dịch và làm tăng khả năng liên kết bằng cách dự đoán và loại bỏ môtip dễ liên kết với MHC lớp 2. Sự hữu ích của tác nhân trị liệu từ trình tự nucleotit được phát triển và được mô tả ở đây có thể được tăng cường bằng cách kiểm soát các đặc tính chức năng bằng tính gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), thời gian bán thải của huyết thanh, isotyp, liên kết thụ thể Fc hoặc các cách kết hợp của các tác dụng này. Các biến thể này có thể được tiến hành bằng phương pháp thiết kế protein, phương pháp thiết kế glycan hoặc phương pháp hóa học. Theo ứng dụng được yêu cầu của tác nhân trị liệu, sự tăng hoặc giảm các hoạt tính này có thể là ưu điểm.

Nhiều phương pháp làm thuần thực ái lực của kháng thể đã được biết trong

lĩnh vực kỹ thuật. Hầu hết các phương pháp này dựa trên chiến dịch chung để tạo ra thư viện protein panen đột biến hoặc protein được cải biến, và sàng lọc và chọn lọc, để làm tăng ái lực. Việc gây đột biến thường được tiến hành ở cấp độ ADN, ví dụ bằng PCR tạo lỗi ngẫu nhiên, bằng kỹ thuật xáo trộn gen, bằng cách sử dụng các hóa chất gây đột biến hoặc bức xạ, bằng cách sử dụng các chủng 'đột biến' có bộ máy sao chép tạo lỗi ngẫu nhiên, hoặc bằng các cách tiếp cận siêu đột biến soma mà sử dụng máy thuần thực ái lực tự nhiên. Việc gây đột biến cũng có thể được tiến hành ở cấp độ ARN, ví dụ bằng cách sử dụng replicaza. Phương pháp dựa trên thư viện cho phép sàng lọc các protein biến đổi được cải thiện có thể dựa trên các kỹ thuật hiển thị khác nhau như thể thực khuẩn, nấm men, ribosom, các tế bào vi khuẩn hoặc tế bào động vật có vú, và đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Sự thuần thực ái lực có thể đạt được bằng các phương pháp dự đoán/định hướng nhiều hơn, ví dụ, bằng cách gây đột biến định hướng điểm hoặc tổng hợp gen được hướng dẫn bằng các phát hiện từ protein 3D. Các phương pháp làm tăng ADCC hoặc CDC sẽ được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Nhiều phương pháp điều biến thời gian bán thải trong huyết thanh và phân bố kháng thể trong cơ thể sống làm thay đổi sự tương tác giữa kháng thể và thụ thể Fc mới sinh đóng vai trò quan trọng để ngăn chặn IgG khỏi sự dị hóa, và duy trì nồng độ kháng thể trong huyết thanh cao. Ví dụ, các patent trong số patent Mỹ số 6,277,375; 6,821,505; 7,083,784, patent Mỹ số 7,217,797 và WO 2000/4207 có thể được đề cập đến. Ví dụ khác về sự thay thế axit amin trong các vùng hằng định điều biến khả năng liên kết của thụ thể Fc và chức năng qua trung gian thụ thể như khả năng liên kết với FcRn và thời gian bán thải trong huyết thanh được mô tả trong patent trong số các đơn xin cấp patent Mỹ số 20090142340; 20090068175; và 20090092599.

Glycan được liên kết với phân tử kháng thể ảnh hưởng đến hoạt tính của kháng thể bao gồm thời gian bán thải trong huyết thanh bằng cách tác động đến sự tương tác của thụ thể Fc và thụ thể glycan. Do đó, dạng glycan kiểm soát hoạt tính của kháng thể có thể tạo ra các ưu điểm cho tác nhân trị liệu. Phương pháp tạo ra dạng glycan được kiểm soát được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng nó không

bị giới hạn ở nội dung được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,602,684; 7,326,681; 7,388,081; và WO 2008/006554.

Phương pháp kéo dài thời gian bán thải bằng cách bổ sung polyetylen glycol (PEG) được sử dụng để kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh của protein.

Thuật ngữ "% đồng nhất" được sử dụng ở đây để mô tả nhiều trình tự. Như sẽ được hiểu, thuật ngữ "% đồng nhất" có nghĩa là khi so sánh hai trình tự trên vùng xác định, hai trình tự có số lượng xác định của gốc giống nhau ở cùng vị trí.

% đồng nhất của một polypeptit so với polypeptit khác có thể được xác định bằng phép phân tích GAP với điểm tạo gap (khoảng trống)=5, và điểm mở rộng gap== 0,3. Trình tự nghi vấn là ít nhất 50 axit amin, và phép phân tích GAP điều chỉnh vùng của hai trình tự trong ít nhất 50 axit amin. Tốt hơn nữa nếu chiều dài của trình tự nghi vấn là ít nhất 100 axit amin, và phân tích GAP điều chỉnh vùng của hai trình tự trong ít nhất 100 axit amin. Thậm trí tốt hơn nữa nếu chiều dài của trình tự nghi vấn ít nhất là 250 axit amin, và phép phân tích GAP sắp xếp hai trình tự trên vùng gồm ít nhất 250 axit amin. Tốt nhất là, phân tích GAP sắp xếp trình tự axit amin của toàn bộ chiều dài của hai polypeptit được cân nhắc.

Đối với polypeptit được xác định, nên hiểu rằng các số về % đồng nhất cao hơn so với các số được đề xuất sẽ bao gồm các phương án được ưu tiên. Do đó, nếu có thể, nên ưu tiên rằng do ít nhất % đồng nhất, polypeptit bao gồm trình tự axit amin liên quan đến SEQ ID NO có độ đồng nhất của axit amin tốt hơn là ít nhất 95% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 97% hoặc lớn hơn, thậm trí tốt hơn nữa là ít nhất 98% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,1% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,2% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,3% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,4% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,5% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,6% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,7% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là ít nhất 99,8% hoặc lớn hơn, thậm trí tốt hơn nữa là ít nhất 99,9% hoặc lớn hơn.

Ở đây, sự thay đổi của trình tự axit amin và trình tự nucleotit có thể được đưa vào và được tạo ra thông qua sự thay đổi của các nucleotit bằng đột biến của axit nucleic in vivo bằng việc xử lý hóa học hoặc phóng xạ. Ví dụ về đột biến này

bao gồm việc làm khuyết (làm mất), xen (cài) hoặc thay thế gốc của trình tự axit amin. Polynucleotit theo sáng chế có thể được tiến hành các kỹ thuật xáo trộn ADN như được mô tả bởi Harayama, 1998 hoặc các phương pháp in vitro khác để tạo ra các polynucleotit được biến đổi mã hóa các biến thể của polypeptit. Kỹ thuật xáo trộn ADN này có thể sử dụng trình tự gen có liên quan đến sáng chế như Rht-B1 từ các loài thực vật khác với lúa mì. Sản phẩm thu được từ ADN đột biến/được cải biến, có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng kỹ thuật được mô tả ở đây để xác định nếu chúng mang, ví dụ, kiểu hình quá tăng trưởng. Ví dụ, việc làm khuyết trình tự axit amin có thể bao gồm việc làm khuyết thường khoảng từ 1 đến 15 gốc axit amin, ví dụ, từ 1 đến 10 gốc axit amin hoặc từ 1 đến 5 gốc axit amin liên tiếp.

Ví dụ, sự thay thế trình tự axit amin có thể bao gồm một hoặc lớn hơn gốc axit amin trong polypeptit được làm mất và một hoặc lớn hơn gốc axit amin mà khác với các gốc axit amin ban đầu được chèn (cài) tại vị trí này.

Như được sử dụng ở đây, “bao gồm hoặc chứa)” có thể được sử dụng theo nghĩa mở bao gồm các thành phần, bước, trị số được bộc lộ, v.v., và không được giải thích với nghĩa để loại trừ các thành phần, bước, trị số, v.v., khác với chúng, và trong các trường hợp, nó không thể loại trừ nghĩa “về cơ bản gồm có”.

Tất cả các tài liệu được đề cập ở đây được bao gồm trong bản mô tả dưới dạng tài liệu tham khảo.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể có khả năng điều trị tế bào gốc ung thư cũng như bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn, và epitop mà kháng thể nhận diện và kháng thể nhận diện chúng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, nhờ đó điều trị bệnh ung thư mạnh mẽ hơn và triệt để và góp phần vào sự phát triển của tác nhân trị liệu tế bào hữu hiệu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nhờ các ví dụ, nhưng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật

này rằng các ví dụ được mô tả dưới đây có thể được cải biến mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể kháng CD43

1-1. Tạo ra kháng thể chuột nhất

1-1-1. Tạo ra tế bào sản sinh kháng thể đơn dòng

Kháng thể này được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào lá lách của chuột nhất trắng Balb/c trong đó tế bào tuyến ức người được tiêm dưới dạng kháng nguyên và dòng tế bào u tủy SP2/0-Ag14 (ATCC, CRL-1581) của chuột nhất kháng 8-azaguanin.

10^7 tế bào tuyến ức người (Bệnh viện Đại học Quốc gia Seoul) được tiêm trong màng bụng vào chuột nhất trắng Balb/c mỗi 2 tuần trong 6 tuần để cảm ứng đáp ứng miễn dịch, và lá lách được tách ra vào 3 ngày sau lần cấy truyền bổ sung cuối để tạo ra huyền phù tế bào. Theo phương pháp của Koeler & Milstein (1975), 10^8 tế bào lá lách và 10^7 tế bào u tủy được dung hợp tế bào bằng cách sử dụng 400 polyetylen glycol. Các tế bào đã dung hợp được rửa và sau đó được tạo huyền phù trong dung dịch nuôi cấy DMEM được bổ sung 100uM hypoxanthin, 0,44uM animopterin và 16uM thymidin (Dung dịch nuôi cấy HAT), và các tế bào được chia thành phần mẫu trong đĩa có 96 giếng (lỗ), và được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy trong đó nhiệt độ 37°C, CO₂ 5% được cung cấp.

Khi quá trình hình thành cụm được quan sát thấy sau 2 tuần, phần dịch nổi được gom lại và hiệu giá kháng thể được đo bằng cách sử dụng kỹ thuật hóa mô miễn dịch và đếm tế bào theo dòng chảy.

Nhóm dương là trường hợp trong đó 10^5 tế bào hoặc nhiều hơn được tạo ra trong mỗi giếng (lỗ). Các tế bào đơn dòng có hiệu giá kháng thể cao được thu gom bằng cách gom các tế bào trong giếng trong đó cụm có hiệu giá kháng thể cao của phần dịch nổi, được tạo ra và được phân dòng theo phương pháp thử nghiệm pha loãng giới hạn. Dung dịch nuôi cấy của các tế bào đơn dòng được dự trữ bằng cách gom phần dịch nổi cho các thử nghiệm sau.

1-1-2. Sàng lọc tế bào đơn dòng sản sinh kháng thể đối với protein bề mặt tế bào của tế bào tuyến ức

Các mô tuyến ức đông lạnh (Bệnh viện Đại học Quốc gia Seoul) và mô gắn trong parafin (Bệnh viện Đại học Quốc gia Seoul) được cắt thành độ dày 4 micromet để sử dụng. Sau khi trải qua quá trình loại bỏ parafin và sau đó bổ sung huyết thanh dê bình thường (sản phẩm của công ty BioGenex), các mô gắn trong parafin được để yên trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi dùng từng kháng thể sơ cấp (Dinona) cho các mô và sau đó để yên chúng trong buồng lạnh 4°C qua đêm để phản ứng, chúng được rửa 3 lần bằng nước muối đệm phosphat vào ngày tiếp theo. Chúng được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với kháng thể dê kháng globulin miễn dịch chuột nhất được biotinyl hóa (2 giọt, DAKO) làm kháng thể thứ hai, và sau đó được rửa 3 lần bằng nước muối đệm phosphat, và thể liên hợp streptavidin-HRP được xử lý. Sau khi dùng dung dịch H₂O₂-aminoethyl carbazol trong 20 phút, chúng được rửa 3 lần bằng nước muối đệm phosphat, và quá trình hiện màu được quan sát bằng kính hiển vi quang học.

Do đó, dòng tế bào đơn dòng H-JL1 sản sinh kháng thể mà chỉ phản ứng đặc hiệu với tế bào tuyến ức người có thể được phân loại. Dòng tế bào thu được được tặng cho Tổ chức nghiên cứu dòng tế bào Hàn Quốc (KCLRF) có địa chỉ tại Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul, Hàn Quốc vào 13/1/1997, và có số hiệu lưu giữ KCLRF-BP-00010.

Mô tuyến ức được nhuộm hóa mô miễn dịch với phần dịch nổi của dòng tế bào đơn dòng đã được chọn lọc, và xác nhận được rằng tế bào tuyến ức được nhuộm dưới dạng tế bào dương (Fig.10). Ngoài ra, tế bào tuyến ức được nhuộm dưới dạng tế bào dương thể hiện khía cạnh là được nhuộm mạnh mẽ trong chu vi của tế bào, và từ đó chứng minh được rằng dòng tế bào đơn dòng sản sinh kháng thể kháng protein bề mặt tế bào.

Để xác nhận phản ứng của kháng thể trong giai đoạn hiện màu của tế bào tuyến ức, quy trình đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện. Tuyến ức của người được tách ra cho phẫu thuật tim được cắt thành các mảnh nhỏ và nghiền bằng phiến kính, và tế bào tuyến ức được gom lại. Sau khi phản ứng kháng thể (1×10^5 tế bào/kháng thể 10µg/mL) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C trong tế bào tuyến ức đã phân lập, nó được rửa bằng nước muối đệm phosphat lạnh, và kháng thể dê kháng globulin

miễn dịch chuột nhất liên kết với FITC (Fluorescein isothiocyanat) (Jackson ImmunoResearch) được cho phản ứng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó nó được rửa bằng nước muối đệm phosphat lạnh và 5µL mỗi kháng thể kháng CD8 liên kết với PE (phycoerythrin) (BD Bioscience) và kháng thể kháng CD4 liên kết với APC (BD Bioscience) được bổ sung và được cho phản ứng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Nó được rửa bằng nước muối đệm phosphat lạnh và quy trình đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện bằng cách sử dụng FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Tế bào tuyến ức được phân loại thành tế bào tuyến ức CD4-CD8 → tế bào tuyến ức CD4+CD8+ → tế bào tuyến ức CD4+CD8- hoặc CD4-CD8+ theo khía cạnh biểu hiện của CD4 và CD8, và kháng thể này được cho phản ứng với tất cả 4 loại tế bào tuyến ức, nhưng đặc biệt là, nó được cho phản ứng với tế bào tuyến ức CD4+CD8+ ở mức độ cao (tham chiếu đến Fig.11). Vùng màu xám trên Fig.11 là nhóm đối chứng âm, và đường nét liền là biểu đồ nhuộm với kháng thể được phân loại.

1-1-3. Sản xuất kháng thể đơn dòng từ dòng tế bào đơn dòng đã phân loại

Chuột nhất Balb/c được tiêm 0,5mL pristan trong màng bụng trước 3 tuần, và 10^7 tế bào đơn dòng được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa huyết thanh bào thai bò 10% và được tiêm trong khoang bụng của các con chuột này, và sau đó cổ trướng của chuột nhất được gom lại sau 2-3 tuần. 5-10mg/mL kháng thể nồng độ cao thu được từ cổ trướng này.

Để tinh chế các kháng thể từ cổ trướng, kỹ thuật sắc ký Q-sepharose (Pharmacia product) và kỹ thuật sắc ký hydroxylapatite (Bio-gel HTP Gel, Pharmacia product) được thực hiện. 3,14g amoni sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ trong mỗi 10ml cổ trướng được bổ sung và được hòa tan từ từ trên đá (50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kết tủa). Hỗn hợp này được ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 30 phút, và chất kết tủa được hòa tan trong nước đã khử ion, và sau đó được thẩm tách trong 1L dung dịch đệm (phosphat 20mM, độ pH = 7,4).

Dung dịch này đi qua cột Q-sepharose được cân bằng với dung dịch đệm (phosphat 20mM, độ pH = 7,4) từ trước và được hấp phụ, và sau đó gradien nồng độ của NaCl chảy đến gradien tuyến tính từ 0M đến 0,8M bằng cách sử dụng dung

dịch đệm I (phosphat 20mM, độ pH = 7,4) và dung dịch đệm II (phosphat 20mM, NaCl 0,5M, độ pH = 7,4), để thu được chất rửa giải. Mỗi phần là phần đã được gom lại chứa nhiều kháng thể bởi 15% SDS-PAGE. Phần này được thẩm tách bằng dung dịch đệm (phosphat 20mM, độ pH = 6,8), và được hấp phụ bằng cách đi qua cột hydroxylapatite được cân bằng với dung dịch đệm (phosphat 20mM, độ pH = 6,8) từ trước, và sau đó gradien nồng độ của phosphat chảy đến gradien tuyến tính từ 0M đến 0,3M bằng cách sử dụng dung dịch đệm III (phosphat 20mM, độ pH = 6,8) và dung dịch đệm IV (phosphat 300mM, độ pH = 6,8), để thu được chất rửa giải. Phần này được gom lại chỉ trong phần có độ tinh khiết kháng thể 95% hoặc lớn hơn bởi 15% SDS-PAGE. Nhờ thử nghiệm này, 5-10mg kháng thể đơn dòng trong mỗi 1ml cổ trứng có thể được gom lại.

Kháng thể thu được gọi là YG5.

1-1-4. Phân tích epitop của CD43

Xây dựng cấu trúc của cấu trúc chứa đoạn CD43 một phần

Như được thể hiện trên Fig.12, mỗi đột biến làm khuyết CD43 được xây dựng cấu trúc, và độ phản ứng của kháng thể YG5 với đột biến làm khuyết được thử nghiệm, và được phân tích về epitop của CD43. Protein CD43 (Số hiệu lưu giữ NCBI M61827.1) gồm có tổng cộng 400 axit amin, và trình tự axit amin từ số 1 đến số 19 là trình tự tín hiệu, và trình tự axit amin từ số 20 đến số 254 là miền ngoại bào, và trình tự axit amin từ số 255 đến số 277 là miền xuyên màng, và trình tự axit amin từ số 278 đến số 400 là miền nội bào.

Sau khi xây dựng cấu trúc cấu trúc ADN để mỗi đột biến làm khuyết được biểu hiện ở đầu cuối C của Glutathion-S- transferaza (GST), nó được xen (cài) vào vector pGEX-2T (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). Sau đây, vector bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 253 của protein CD43 được gọi là pGEX1-253, và vector bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 87 được gọi là pGEX1-87, và vector bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 87 của protein CD43 được gọi là pGEX1-81, và vector bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 75 của protein CD43 được gọi là pGEX1-75, và vector bao gồm trình tự axit amin từ số 1 đến số 70 của protein CD43 được gọi là pGEX1-70, và vector bao gồm trình tự axit amin từ số 70 đến số

98 của protein CD43 được gọi là pGEX70-98, và pGEX71-81, pGEX76-81, pGEX73-81, và pGEX73-80 được đặt tên theo nguyên tắc giống như ở trên.

Trình tự mã hóa đột biến làm khuyết được khuếch đại từ ADN bổ trợ của CD43 người, và các đoạn mồi PCR được xây dựng cấu trúc từ trình tự trên Genbank, và vị trí enzym giới hạn BamHI/EcoRI hoặc BamHI/BglII được bao gồm. Các sản phẩm PCR được cắt bằng BamHI/EcoRI hoặc BamHI/BglII và liên kết với pGEX-2T của cùng một vị trí enzym giới hạn, và sau đó được biến nạp vào tế bào TOP10F' khả biến *E. coli* [F' [lacIq, Tn10(TetR)], mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC), 80lacZDM15, lacX74, deoR, recA1, araD139 D(ara-leu)7697, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG]. Trình tự của thể biến nạp được phân tích, từ đó xác nhận lại trình tự của đột biến làm khuyết.

Biểu hiện protein dung hợp đột biến khuyết GST-CD43

Tế bào *E. coli* TOP10 đã biến nạp được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường LB trong đó 50µg/mL ampicilin được bổ sung qua đêm và tế bào đã nuôi cấy được pha loãng gấp 20 lần với môi trường LB, và sau đó nó được nuôi cấy trong 3 đến 4 giờ đến OD 0,6. IPTG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là 1mM và nó được nuôi cấy trong 4 giờ nữa, và sau đó nó được ly tâm ở 6000 g trong 15 phút. Sau khi gom các tế bào chỉ có các tế bào và được tạo huyền phù với 3ml dung dịch đệm làm tan (Tris 50mM, độ pH = 8,0, EDTA 1mM, NaCl 100mM) trong mỗi 1g tế bào, nồng độ cuối 0,2mM của phenylmethylsulfonyl florua (Sigma Chemical Co.) được bổ sung và sau đó đặt trên đá trong 30 phút.

Phân tích CD43 epitop

Sau khi các dịch tan tế bào của từng thể biến nạp biểu hiện tổng cộng 11 loại đột biến làm khuyết được đưa vào 10% SDS-PAGE, kỹ thuật thâm tách tây được thực hiện với kháng thể YG5 và kháng thể kháng GST, theo thứ tự.

Fig.13 là quy trình thâm tách tây xác nhận độ phản ứng của kháng thể YG5 với 11 loại đột biến làm khuyết, trong đó A là trường hợp sử dụng kháng thể YG5, và B là trường hợp sử dụng kháng thể GST. Ngoài ra, làn 1 là pGEX1-253, và làn 2 là pGEX1-98, và làn 3 là pGEX1-87, và làn 4 là pGEX1-81, và làn 5 là pGEX1-75,

và làn 6 là pGEX1-70, và làn 7 là pGEX70-98, và làn 8 là pGEX71-81, và làn 9 là pGEX73-81, và làn 10 là pGEX76-81, và làn 11 là pGEX73-80, và làn 12 là pGEX-2T, và làn 13 là tế bào tuyến ức người. Như được thể hiện trên Fig.13, đơn vị nhỏ nhất của đột biến làm khuyết có tính phản ứng với kháng thể YG5 được xác nhận là pGEX73-81, và từ đó chứng minh được rằng thể quyết định kháng nguyên của CD43 là trình tự axit amin từ số 73 đến số 81 (Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile; SEQ ID NO: 4).

Để tóm tắt các ví dụ, thấy được rằng YG5 nhận diện trực tiếp trình tự axit amin từ số 73 đến số 81, không phải thành phần glyco của CD43 glycoprotein, khác với các kháng thể thông thường khác. Trình tự này được cho tiếp xúc chủ yếu trong tế bào nguyên thủy của tế bào lympho và tế bào tuyến ức trong giai đoạn hiện màu của nguyên bào máu, và từ đó kháng thể YG5 nhận diện nó, và nó được che phủ bằng cách glycosyl hóa hoặc thay đổi cấu trúc quanh trình tự axit amin từ số 73 đến số 81 trong tế bào gốc tạo máu, nhưng tế bào máu trắng trưởng thành và tiểu cầu, và vì thế cả kháng thể YG5 có thể không nhận diện nó.

1-2. Tạo ra kháng thể khảm

Dựa trên trình tự axit amin của kháng thể chuột nhất kháng CD43 đã xây dựng cấu trúc YG5, kháng thể khảm kháng CD43 được tạo ra.

1-2-1. Tạo ra plasmit

Đối với sự biểu hiện của kháng thể khảm kháng CD43, plasmit để biểu hiện chuỗi nặng và biểu hiện chuỗi nhẹ lần lượt được tạo ra. Vector pOptiVEC (Invitrogen Company) được sử dụng cho plasmit để biểu hiện chuỗi nặng, và vector pcDNA3.3 (Invitrogen Company) được sử dụng cho plasmit để biểu hiện chuỗi nhẹ. ADN bổ trợ mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để biểu hiện kháng thể được tách dòng bằng cách sử dụng bộ mồi Ig-Primer (Novagen Company), và nó được xen vào vector pGem-T (Promega Company), và sau đó trình tự ADN được xác nhận bằng cách giải trình tự, và gen kháng thể chuột nhất được xác nhận bằng vị trí IMGT (www.imgt.org).

Để biểu hiện ADN bổ trợ mã hóa vùng biến đổi và ADN bổ trợ mã hóa vùng không biến đổi của mỗi kháng thể dưới dạng trình tự axit amin liên tiếp mà không

xen axit amin bổ sung vào, các đoạn gen trong đó trình tự mã hóa của vùng biến đổi đã tách dòng liên kết với trình tự mã hóa vùng không biến đổi IgG1 ở người đã biết (chuỗi nặng) và vùng không biến đổi kapa (chuỗi nhẹ) lần lượt được tổng hợp (Bioneer Inc). Sau khi gen biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được tổng hợp như trên được cắt bằng enzym giới hạn Xho I và Sal I, đoạn gen chuỗi nặng được nối vào vector pOptiVec, và đoạn gen chuỗi nhẹ được nối vào vector pcDNA3.3, một cách tương ứng, từ đó xây dựng cấu trúc plasmit hoàn thiện để biểu hiện kháng thể (pcDNA3.3-plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kháng CD43 và pOptiVEC-plasmit biểu hiện chuỗi nặng kháng CD43). Quy trình xây dựng cấu trúc của plasmit biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện sơ lược trên Fig.14.

2-1-2. Biến nạp

Quy trình biến nạp được thực hiện bằng cách chuyển nhiễm pcDNA3.3-plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kháng CD43 và pOptiVEC-plasmit biểu hiện chuỗi nặng kháng CD43 đã được xây dựng cấu trúc vào tế bào DG44 (Invitrogen) thu được từ CHO.

Trước tiên, tế bào DG44 đã được tạo huyền phù được biến đổi thích hợp với môi trường MEM α chứa FBS 5% 3 ngày trước khi chuyển nhiễm, từ đó chuyển hóa nó thành tế bào được hấp phụ cần biến đổi thích hợp để gia tăng hiệu quả chuyển nhiễm. Quá trình chuyển nhiễm được thực hiện trong đĩa có 6 giếng (lỗ) bằng cách sử dụng chất phản ứng (thuốc thử) chuyển nhiễm Effectene (QIAGEN Company). Tế bào DG44 đã biến đổi thích hợp được cấy chuyển ở nồng độ bằng 1×10^5 tế bào/giếng một ngày trước khi chuyển nhiễm được tạo ra, và lượng ADN được sử dụng để chuyển nhiễm được sử dụng trong cùng một lượng 2 μ g mỗi pcDNA3.3-plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kháng CD43 và pOptiVEC-plasmit biểu hiện chuỗi nặng kháng CD43. Quy trình chuyển nhiễm được thực hiện trong 48 giờ. Để phân loại nhóm tế bào đã được chuyển nhiễm, phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy và thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELIA) được thực hiện, do đó, hai dòng vô tính của E#4, E#5 được chọn lọc. Nhóm tế bào đã được chọn lọc được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc MEM α chứa 5% huyết thanh bào thai bò đã thẩm tách chứa Methotrexat 30nM (MTX) và 400 μ g/mL G418 (Geneticin) và nồng độ của

MTX và G418 được tăng dần lên để chọn lọc nhóm tế bào được biến nạp.

2-1-3. Nuôi cấy tế bào đã được biến nạp và tinh chế kháng thể

Nhóm tế bào đã được chuyển nhiễm và chọn lọc trên đây ($24,0 \times 10^5$ tế bào/mL hoặc lớn hơn, khả năng sống sót (%) 90% hoặc lớn hơn) được nuôi cấy cho đến khi mức độ biểu hiện đạt được bằng 600mg/L (theo tiêu chuẩn IPC (kiểm soát trong quy trình)) trong môi trường Power CHO2 CDM (Lonza; lượng môi trường cuối 880L) trong điều kiện là 37°C và CO₂ 5%.

Sau quy trình làm trong tế bào (sử dụng thiết bị lọc POD (1,1/0,2μm)) bằng cách gom 800L dung dịch nuôi cấy thu được như trên, kháng thể được tinh chế bằng quy trình cột 3 giai đoạn (Sắc ký ái lực protein A (pha tĩnh: ProteinA, dung dịch đệm cân bằng: Natri phosphat 50mM, natri clorua 50mM, độ pH = 7,5, dung dịch đệm rửa giải: natri xitrat 20mM độ pH = 3,0); sắc ký trao đổi cation (pha tĩnh: SP FF, dung dịch đệm cân bằng: natri xitrat 20mM độ pH = 5,5, dung dịch đệm rửa giải: natri xitrat 20mM, 150mM, natri clorua, độ pH = 6,1); sắc ký trao đổi anion (pha tĩnh: Q FF, dung dịch đệm cân bằng: natri xitrat 20mM, độ pH = 6,5)).

Điều kiện sắc ký là như sau:

	Protein A	Trao đổi cation	Trao đổi anion
Kiểu cột	Mabselect sure	SP FF	Q FF
Bộ điều khiển cột	6mm Bioprocess (CL-3271)	10mm Bioprocess (CL-3201)	10mm Bioprocess (CL-3201)
Kích thước cột	BPG 200	BPG 300	BPG 300
Thể tích cột	6,5L	14,0L	14,0L
Chiều cao cột	20cm	20cm	20cm
Tốc độ dòng chảy	62,8L/giờ	141L/giờ	141L/giờ

Dạng phối trộn của chất lỏng thô cuối được hoàn thành bằng cách thực hiện đồng thời quy trình trao đổi và cô đặc đậm thông qua quy trình siêu lọc/thẩm tách siêu lọc (UF/DF), và nồng độ của protein cuối được điều chỉnh đến 11,5mg/mL.

Kháng thể khả kháng CD43 thu được bằng quy trình như trên, và gọi là DNP001.

2-1-4. Xác nhận khả năng liên kết của vùng epitop của kháng thể khả

Để xác nhận rằng kháng thể khả đã được tạo ra DNP001 (có vùng CDR

giống như kháng thể chuột nhất) liên kết với cùng một epitop như kháng thể chuột nhất, peptit epitop đã được tổng hợp được kết hợp theo phương pháp hóa học với protein albumin huyết thanh bò (BSA), và sau đó ELISA được thực hiện.

- Trình tự tổng hợp peptit epitop (gọi là DN2)

EGSPLWTSIGASTGSC (SEQ ID NO: 129; epitop được biểu thị bằng cách gạch chân)

Thế liên hợp peptit DN2-BSA được tạo ra bằng cách liên hợp peptit DN2 đã được tổng hợp vào protein BSA thông qua liên kết EDC. Sau đó, tỷ lệ mol của peptit: protein BSA là 15:1.

Sau khi phủ thế liên hợp peptit DN2-BSA đã được tạo ra ở nồng độ 50µg/mL trong mỗi giếng, kháng thể khảm DNP001 được ủ ở các gradien nồng độ khác nhau. Tiếp đó, kháng thể liên kết với thế liên hợp được phát hiện bằng cách đo độ phản ứng của kháng thể khảm với thế liên hợp peptit DN2-BSA. Kháng thể được liên kết được phát hiện bởi kháng kháng thể người-HRP (kháng Ig người-HRP), và các giá trị OD ở 450nm được đo và được thể hiện trong bảng sau và trên Fig.42.

Kháng thể khảm (ug/ml)	Giá trị OD
100	1,878
50	1,398
25	0,803
12,5	0,5
6,25	0,327
3,13	0,204
1,56	0,137
0	0,007

Như được thể hiện trong kết quả của bảng này và Fig.42, chứng minh được rằng kháng thể khảm DNP001 liên kết với peptit epitop theo cách phụ thuộc vào nồng độ.

Ví dụ 2: Nghiên cứu mức độ biểu hiện của epitop CD43 ở dòng tế bào ung thư rắn ở người

Để nghiên cứu mức độ biểu hiện của CD43 ở các dòng tế bào ung thư rắn khác nhau, quy trình nhuộm miễn dịch và đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện.

Thông tin về các dòng tế bào được sử dụng để phân tích là như sau:

Tên	Nguồn gốc	Mô bệnh học	Số hiệu lưu giữ
SNU-1	dạ dày, vùng dạ dày	caxinom tuyến	ATCC, CRL-5971
SNU-719	dạ dày	caxinom tuyến, nguyên phát	KCLB, No.00719
NCI-N87	dạ dày	caxinom; di căn đến gan	ATCC, CRL-5822
AGS	dạ dày	caxinom tuyến	ATCC, CRL-1739
HT29	ruột kết	caxinom tuyến	ATCC, HTB-38
LS174T	ruột kết	Duke typ B, caxinom tuyến đại trực tràng	ATCC, CL-188
HCT116	ruột kết	Caxinom đại trực tràng	ATCC, CCL-247
C3A	gan	Caxinom tế bào gan	ATCC, CRL-10741
HepG2	gan	U nguyên bào gan	ATCC, HB-8065
PLC/PRF/5	gan	Ung thư gan	ATCC, CRL-8024

Cụ thể, mỗi dòng tế bào được cấy truyền và được nuôi cấy trong 100mm thiết bị chứa môi trường nuôi cấy tế bào, và khi 70~80% bề mặt được che phủ tế bào nuôi cấy, tế bào nuôi cấy này được rửa bằng dung dịch đệm phosphat và sau đó được xử lý bằng Trypsin-EDTA (Invitrogen), và được phân ly, và sau đó được ly tâm. Tế bào đã kết tủa được tạo huyền phù trong dung dịch đệm một lần nữa và được chia thành phần mẫu 1×10^5 mỗi phần, và $1,5\mu\text{L}$ kháng thể kháng CD43 (YG5)-phycoerythrin (PE) đã được tạo ra trong ví dụ 1-1 được bổ sung và được cho phản ứng trong tủ lạnh 4°C trong 20 phút. Sau khi phản ứng ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút, tế bào được rửa bằng 4ml dung dịch đệm (1 x Nước muối đệm phosphat, chất đệm PBS) một lần nữa, sau đó nó được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Để so sánh, thử nghiệm giống như vậy sử dụng kháng thể DFT-1 ($2\mu\text{L}$, Ancell corporation) thay vì kháng thể kháng CD43 được thực hiện.

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2a-Fig.2c. Trên Fig.1, trục X thể hiện mức độ biểu hiện của kháng nguyên CD43 mà phản ứng với kháng thể YG5 trong dòng tế bào được nêu và trục Y chỉ số lượng tế bào đọc (số đếm). Như được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2a-Fig.2c, khoảng 60% mức độ biểu hiện được

thể hiện trong caxinom tuyến Duke typ B (LS174T) ở bệnh ung thư trực tràng, và khoảng 50, 37% mức độ biểu hiện được thể hiện trong HCT116, HT29, và sự biểu hiện của CD43 (epitop) được xác nhận trong các loại dòng tế bào ung thư rắn khác nhau khác.

Ví dụ 3: Thử nghiệm tính gây độc tế bào của kháng thể kháng CD43 với tế bào ung thư (*in vitro*)

3-1. Tạo ra thể liên hợp kháng thể-độc tố

Việc liên hợp saporin (Sigma, St. Louis, MO) với kháng thể đơn dòng được thực hiện theo phương pháp thông thường (Polito et al., 2004). Sau khi hòa tan kháng thể (DNP001; được tạo ra trong ví dụ 1-2) và saporin ở nồng độ bằng 2mg/mL (nồng độ kháng thể) và 8mg/mL (nồng độ saporin), một cách tương ứng trong chất đệm natri borat 50mM (độ pH = 9,0), 2-iminothiolan (Sigma) được xử lý ở nồng độ bằng 0,4mM và 1,0mM, một cách tương ứng. Sau đó, kháng thể và saporin được trộn ở tỷ lệ bằng 10:1 và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ, và thể liên hợp kháng thể-saporin được tinh chế bằng kỹ thuật lọc gel. Sau đây, thể liên hợp đã được tạo ra được mô tả dưới dạng thể liên hợp kháng CD43-saporin.

Tham khảo phương pháp trên đây, thể liên hợp kháng CD43-MMAE trong đó kháng thể kháng CD43 (DNP001; được tạo ra trong ví dụ 1-2) và monomethyl auristatin E (MMAE; Creative Biolabs) được liên hợp, thể liên hợp kháng CD43-DM1 trong đó kháng thể kháng CD43 (DNP001) và N2'-diacetyle-N2'-(3-mercaptopropyl) maytansin (DM1; The Chemistry Research Solution LLC) được liên hợp, và thể liên hợp kháng CD43-Duocarmyxin trong đó kháng thể kháng CD43 (DNP001) và Duocarmyxin (The Chemistry Research Solution LLC) được liên hợp, và thể liên hợp kháng thể kháng CD43 (DNP001)-DM1 được tạo ra, một cách tương ứng.

3-2. Tính gây độc tế bào của thể liên hợp kháng thể kháng CD43-độc tố với tế bào ung thư dạ dày

Tính gây độc tế bào của thể liên hợp kháng thể-độc tố được tạo ra trong ví dụ 3-1 (thể liên hợp kháng CD43-saporin, thể liên hợp kháng CD43-DM1, thể liên hợp kháng CD43-MMAE, và thể liên hợp kháng CD43-Duocarmyxin) với tế bào

ung thư dạ dày được thử nghiệm.

Ngày trước thử nghiệm, dòng tế bào ung thư dạ dày NCI-N87, AGS, và SNU719 lần lượt được dàn trên đĩa ở 4×10^3 trong mỗi giếng. Mỗi thể liên hợp kháng thể-độc tố được xử lý vào mỗi dòng tế bào dạ dày ở nồng độ bằng 10000ng/mL (trong trường hợp thể liên hợp (kháng thể kháng CD43)-MMAE và thể liên hợp (kháng CD43)-DM1) hoặc 1000ng/mL (trong trường hợp thể liên hợp (kháng CD43)-Duocarmyxin). Sau đó, 10 μ L EzCytos (Daeil lab, Hàn Quốc) được bổ sung vào mỗi giếng sau 24 giờ, 48 giờ, và 72 giờ, và các tế bào được nuôi cấy trong thiết bị chứa CO₂ 37°C, và sau đó khả năng sống sót của chúng được đo bằng máy chụp ảnh quang phổ hiển vi.

Tính gây độc tế bào của mỗi thể liên hợp thu được được thể hiện trên Fig.3 (thể liên hợp (kháng thể kháng CD43)-MMAE), Fig.4 (thể liên hợp (kháng CD43)-DM1) và Fig.5 (thể liên hợp (kháng CD43)-Duocarmyxin). Độ gây độc tế bào được tính bằng đẳng thức sau:

$$\text{Độ gây độc tế bào (\%)} = [1 - (\text{số lượng tế bào sống sót} / \text{số lượng tế bào ban đầu})] \times 100$$

Như được thể hiện trên Fig.3, Fig.4 và Fig.5, xác nhận được rằng thể liên hợp kháng CD43-DM1 và thể liên hợp kháng CD43-MMAE thể hiện tính gây độc tế bào ở tất cả 3 loại dòng tế bào, và thể liên hợp kháng CD43-Duocarmyxin thể hiện tính gây độc tế bào ở NCI-N87 và AGS.

Ví dụ 4: Thử nghiệm tác dụng chống ung thư của kháng thể kháng CD43 trong mô hình động vật (*in vivo*)

4-1. Tạo ra mô hình động vật ung thư dạ dày (Tạo u)

Mô hình ung thư dạ dày được tạo ra bằng cách sử dụng dòng tế bào trong đó sự biểu hiện CD43 được xác nhận trong kết quả của ví dụ 2 (NCI-N87; ATCC, CRL-5822). Trước tiên, 2,8X10⁷ tế bào NCI-N87 được chuẩn bị. Các tế bào đã được chuẩn bị được cấy truyền dưới da 5X10⁶ tế bào/100 μ L (RPMI) vào phía bên phải của chuột nhắt trụi lông. Chuột nhắt trụi lông đã được cấy truyền được sắp xếp vào nhóm đối chứng (dùng PBS) và nhóm thử nghiệm, và kháng thể kháng CD43 (DNP001) được tạo ra trong ví dụ 1-2 được tiêm vào tĩnh mạch đuôi với lượng bằng 12mg/kg 2 lần

mỗi tuần trong 3 tuần vào 3 ngày, hoặc 0,2mg/kg thể liên hợp kháng CD43-Duocarmyxin (DNP001-Duocarmyxin) được tạo ra trong ví dụ 3-1 được tiêm trong màng bụng một lần mỗi tuần trong 3 tuần, sau khi cấy truyền tế bào ung thư. Kích thước khối u được đo trước khi dùng tác nhân trị liệu 2 lần mỗi tuần, và kích thước khối u được tính bằng đẳng thức sau:

$$\text{Kích thước khối u (mm}^3\text{)} = (\text{trục chính} \times \text{trục phụ}^2) / 2$$

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.6. Như được thể hiện trên Fig.6, xác nhận được rằng sự phát triển của khối u bắt đầu được ức chế trong nhóm dùng DNP001-Duocarmyxin (D-Duo) so với nhóm đối chứng từ ngày thứ 7 sau khi bắt đầu thử nghiệm. 26 ngày sau khi bắt đầu thử nghiệm, kích thước khối u trung bình của chuột nhất được dùng DNP001-Duocarmyxin, DNP001 một mình, và PBS lần lượt là 447,2mm³, 510,9mm³, 784,6mm³. Trong trường hợp nhóm trong đó thể liên hợp kháng CD43-Duocarmyxin và kháng thể kháng CD43 được dùng, sự phát triển của khối u được ức chế lần lượt khoảng 43% và 34%, so với nhóm đối chứng. Kết quả này cho thấy tác dụng ức chế đáng kể sự phát triển bệnh ung thư dạ dày của kháng thể kháng CD43 một mình và thể liên hợp kháng CD43-Duocarmyxin.

Ví dụ 5: Nghiên cứu sự phân bố CD43 trong mô bệnh ung thư thể rắn của người

Ngoài bệnh ung thư dạ dày, để xác nhận sự biểu hiện của CD43 và khả năng thử nghiệm độ hiệu nghiệm trị liệu trong các bệnh ung thư thể rắn khác nhau, (bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư dạ dày tế bào nhẵn đóng dấu, bệnh ung thư vú, caxinom tuyến ống thâm nhiễm trong số bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, sacôm bạch cầu hạt) hướng đích CD43, phương pháp hóa mô miễn dịch được thực hiện ở các mô khối u có nguồn gốc từ người khác nhau.

Việc nhuộm hóa mô miễn dịch được tiến hành theo thứ tự sau. Để làm mô bệnh ung thư thể rắn, mô bệnh ung thư thể rắn gắn trong parafin (Bệnh viện đại học quốc gia Chungbuk) được sử dụng. Trước tiên, lát cắt bệnh ung thư thể rắn parafin trải qua quá trình khử parafin với 3 lần xylen trong 10 phút mỗi lần, hai lần với rượu 100% trong 5 phút mỗi lần, rượu 80% trong 3 phút, rượu 50% trong 1 phút, rượu 20% trong 1 phút, và sau đó được rửa bằng nước máy hai lần. Sau đó, nó được ngâm

trong 1 x TBS (Nước muối đệm Tris) trong 10 phút. Để tái tạo kháng nguyên trong mô, chất đệm HEPES 10mM (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic, độ pH = 8,0) được bổ sung và tiến hành trong vi sóng trong 15 phút và làm mát nhanh trong nước máy, và lát cắt sau đó được ngâm trong 1 x TBS trong 20 phút. Peroxidaza nội sinh được loại bỏ bằng H_2O_2 0,1% + metanol 100% trong 10 phút và được rửa bằng nước máy hai lần. Sau đó, để loại bỏ phản ứng không đặc hiệu của biotin và kháng nguyên-kháng thể, quy trình phong bế được tiến hành. Quy trình phong bế được thực hiện bằng cách nhỏ 4 giọt dung dịch biotin vào và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Sau khi nhỏ 4 giọt dung dịch avidin (VECTOR laboratories) vào mô, nó được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút và sau đó được rửa bằng 1xPBS.

10 μ g/mL, 5 μ g/mL mỗi kháng thể kháng CD43 (YG5) và kháng thể DFT-1 (nhóm đối chứng; Ancell corporation) được tạo ra trong ví dụ 1-1 được tạo huyền phù trong 150 μ L của 1 x TBS để bao phủ mô, và nó được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi rửa kháng thể bằng 1 x TBST (1 x TBS+ tween 20 0,1%) 3 lần trong 15 phút mỗi lần, kháng thể thứ hai (HRP kháng chuột nhất/thỏ; DAKO) được bao phủ mô 2 giọt mỗi lần, và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau đó, sau khi rửa kháng thể bằng 1 x TBST (1 x TBS+ tween 20 0,1%) 3 lần trong 15 phút mỗi lần, phản ứng hiện màu được thực hiện với DAB (Diaminobenzidin). Sau khi rửa kháng thể bằng 1 x TBS trong 5 phút hai lần và nhuộm tương phản, nó được rửa bằng nước máy. Sau đó, sau quy trình khử hydrat được tiến hành, nó được lắp đặt.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.7 và Fig.8 và Bảng 1. Tiêu chuẩn để xác định tính dương CD43 trong mỗi mô là như sau: âm tính: 0, dương tính: được phân loại thành 1 đến 3 bậc theo mức độ nhuộm YG5 trong vùng khối u.

Bảng 1. Sự biểu hiện của CD43 trong các phần mô ung thư khác nhau

Gốc	Tổng (n)	Dương (n)	%, tính dương
Dạ dày	213	179	84
Vú	231	90	39
Phổi	28	13	46
Thận	54	5	9

Tuyến tụy	30	3	10
Tuyến giáp	21	1	5
Túi mật	4	1	25
Tử cung	2	1	50
Bàng quang	5	2	40
Cổ tử cung	4	1	25

(Trong bảng 1, tính dương là giá trị số thu được bằng cách chia số lượng mô dương ngoại trừ mô âm trong đó YG5 không được nhuộm cho tổng số lượng mô của bệnh ung thư tương ứng;

Tổng là tổng cộng số lượng mô được sử dụng để nhuộm;

Dương là số lượng mô thể hiện phản ứng dương tính với YG5 trong số các mô được sử dụng, một cách tương ứng)

Như được xác nhận trong bảng 1, Fig.7 và Fig.8, chứng minh được rằng CD43 được biểu hiện trong khối u xuất hiện trong tế bào biểu mô chủ yếu như bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư dạ dày tế bào nhẵn đóng dấu, bệnh ung thư vú, caxinom tuyến ống thâm nhiễm trong số bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, sacôm bạch cầu hạt, v.v..

Ví dụ 6: Sự biểu hiện CD43 trong tế bào gốc ung thư của bệnh ung thư dạ dày

Mức độ biểu hiện của CD43 trong các tế bào gốc ung thư của các khối u khác nhau được thử nghiệm. CD44 và CD133 (Prominin-1) là chỉ thị tế bào gốc ung thư phổ biến đã biết. Chỉ thị tế bào gốc ung thư CD44 và CD133 được nhuộm ba lần để xác nhận sự biểu hiện CD43, từ đó chứng minh rằng CD43 được biểu hiện trong CD44 hoặc nhóm dương tính CD44⁺CD133⁺. Tế bào NCI-N87 được cấy truyền và được nuôi cấy trong 100mm thiết bị chứa môi trường nuôi cấy tế bào, và khi 70~80% bề mặt được che phủ tế bào nuôi cấy, tế bào nuôi cấy được rửa bằng dung dịch đệm phosphat và sau đó được xử lý bằng Trypsin-EDTA (Invitrogen), và được phân ly, và sau đó được ly tâm. Tế bào đã kết tủa được tạo huyền phù trong dung dịch đệm một lần nữa. Sau khi cho chúng phản ứng với kháng CD44-allophycocyanin (APC) (10µL, Miltenyi Biotec), kháng CD133-fluorescein isothiocyanat (FITC) (10µL, Miltenyi Biotec), và kháng thể kháng CD43 (được tạo ra trong ví dụ 1; YG5)-phycoerythrin (PE; 1,5µL, Dinona) trong tủ lạnh 4°C trong 20 phút, kháng thể không

phản ứng được rửa và được cố định với paraformaldehyt 1%. Sau đó các tế bào được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Thử nghiệm giống như vậy sử dụng IgG1 chuột nhắt thay vì kháng thể kháng CD44 và kháng thể kháng CD133 làm nhóm đối chứng âm được thực hiện.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.9.

Như được thể hiện trên Fig.9, nhờ kết quả xác nhận sự biểu hiện của CD43 trong tế bào gốc ung thư của bệnh ung thư dạ dày, xác nhận được rằng CD43 dương tính trong các tế bào trong đó các chỉ thị biệt hóa tế bào gốc ung thư của bệnh ung thư dạ dày (CD44 hoặc CD133) là dương tính. Kết quả này cho thấy rằng kháng thể kháng CD43 theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với CD43 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào gốc ung thư của bệnh ung thư dạ dày.

Ví dụ 7: Nghiên cứu sự biểu hiện của CD43 trong các tế bào gốc ung thư rắn khác nhau

Sự biểu hiện của CD43 trong tế bào gốc ung thư của bệnh ung thư thể rắn dương tính với CD43 nêu trong ví dụ 5 được xác nhận bằng cùng một phương pháp nêu trong ví dụ 6.

Các tế bào có nguồn gốc từ mỗi mô dương tính với CD43 được bộc lộ trong ví dụ 5 (dòng tế bào có nguồn gốc từ bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư gan và bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang) được sử dụng. Mỗi tế bào được cấy truyền và được nuôi cấy trong 100mm thiết bị chứa môi trường nuôi cấy tế bào, và khi 70~80% bề mặt được che phủ tế bào nuôi cấy, tế bào nuôi cấy được rửa bằng dung dịch đệm phosphat và sau đó được xử lý bằng Trypsin-EDTA (Invitrogen), và được phân ly, và sau đó được ly tâm. Khối tế bào đã kết tủa được tạo huyền phù trong dung dịch đệm một lần nữa và được cho phản ứng với kháng CD44-allophycocyanin (APC) được pha loãng 100 lần, kháng CD44-allophycocyanin (APC), kháng CD326 (EpCAM)-allophycocyanin (APC), kháng CD133-fluorescein isothiocyanate (FITC), kháng thể kháng CD43-phycoerythrin

(PE) trong tủ lạnh 4°C trong 20 phút. Kháng thể không phản ứng được rửa và được cố định với paraformaldehyt 1%, và sau đó các tế bào được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Do đó, nhờ kết quả xác nhận sự biểu hiện CD43 trong tế bào gốc ung thư của tế bào có nguồn gốc từ mô dương tính với CD43 trong ví dụ 5, xác nhận được rằng CD43 là dương tính trong các tế bào trong đó các chỉ thị biệt hóa mỗi tế bào gốc ung thư (CD44, CD133, hoặc EpCAM) là dương tính.

Ví dụ 8: Thử nghiệm sự biểu hiện CD43 trong tế bào gốc ung thư của mô ung thư mới của bệnh nhân

Dựa trên kết quả của ví dụ 5, sự biểu hiện của CD43 được thử nghiệm sau khi phân loại bằng cách sử dụng chỉ thị tế bào gốc ung thư trong mô ung thư của bệnh nhân.

Mô ung thư mới của bệnh nhân được đơn dòng hóa đồng đều. Tế bào khối u đã được đơn dòng hóa được ly tâm ở 1700 vòng/phút trong 3 phút và sau đó phần dịch nổi được loại bỏ, và nó được tạo lại huyền phù vào 10mL môi trường chứa FBS 10% và sau đó được ly tâm ở 1700 vòng/phút trong 3 phút. Phần dịch nổi được loại bỏ và nó được tạo lại huyền phù với 10mL 1 X PBS, và sau đó được đếm. Các tế bào được phân bố vào các ống FACS, và sau đó sau khi cho chúng phản ứng với kháng CD44-allophycocyanin (APC), kháng CD44-allophycocyanin (APC), kháng CD326 (EpCAM)-allophycocyanin (APC), kháng CD133-fluorescein isothiocyanat (FITC), kháng thể kháng CD43-phycoerythrin (PE) trong tủ lạnh 4°C trong 20 phút, kháng thể không phản ứng được rửa và được cố định với paraformaldehyt 1%, và sau đó các tế bào được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Như trên, nhờ kết quả của thử nghiệm sự biểu hiện CD43 trong tế bào gốc ung thư của bệnh ung thư dạ dày trong tế bào gốc ung thư của mô ung thư của bệnh nhân, xác nhận được rằng CD43 là dương tính trong tế bào gốc ung thư có nguồn gốc từ mô ung thư của bệnh nhân.

Ví dụ 9: Ưc chế sự hình thành cụm tế bào gốc ung thư bằng kháng thể kháng CD43

(*in vitro*)

Xác nhận được rằng sự hình thành cụm tế bào gốc dương tính với CD43 trong bệnh ung thư thể rắn dương tính với CD43 có trong ví dụ 5 được ức chế bằng kháng thể kháng CD43 được xác nhận trong ví dụ 6. Các tế bào có nguồn gốc từ mỗi mô dương tính với CD43 được bộc lộ trong ví dụ 5 (dòng tế bào có nguồn gốc từ bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư gan và bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang) được sử dụng. Mỗi dòng tế bào được cấy truyền và được nuôi cấy trong 100mm thiết bị chứa môi trường nuôi cấy tế bào, và khi 70~80% bề mặt được che phủ tế bào nuôi cấy, tế bào nuôi cấy được rửa bằng dung dịch đệm phosphat và sau đó được xử lý bằng Trypsin-EDTA (Invitrogen), và được phân ly, và sau đó được ly tâm. Khối tế bào đã kết tủa được tạo huyền phù trong dung dịch đệm một lần nữa và kháng thể kháng CD43 được bổ sung ở nồng độ bằng 20 μ g/mL trong mỗi 10⁷ tế bào khối u và được cho phản ứng trong tủ lạnh 4°C trong 20 phút, và sau đó kháng thể không phản ứng được rửa bằng 1 X PBS. Sau khi bổ sung 20 μ L IgG liên kết với hạt từ tính, nó được cho phản ứng trong tủ lạnh 4°C trong 15 phút và sau đó được rửa bằng 1 X PBS, và tế bào dương tính với CD43 được phân loại bằng hệ thống tách MACS.

Sau khi cho các tế bào dương tính với CD43 đã phân loại hoặc các tế bào âm tính phản ứng với kháng CD44-allophycocyanin (APC), kháng CD326(EpCAM)-allophycocyanin (APC), kháng CD133-fluorescein isothiocyanate (FITC), kháng thể kháng hạt từ tính-phycoerythrin (PE, 20 μ L, Miltenyi Biotec) trong tủ lạnh 4°C trong 15 phút, nó được rửa và được cố định với paraformaldehyde 1%, và sau đó được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Tế bào dương tính hoặc tế bào âm tính với CD43 thu được từ các ví dụ được bổ sung trong đĩa có 6 giếng gắn siêu thấp (Corning Inc., Corning, NY, USA) ở số lượng 5000 trong mỗi giếng trong giếng chứa môi trường không huyết thanh (100IU/ml penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin, 20ng/mL yếu tố sinh trưởng biểu

bì tái tổ hợp ở người (hrEGF), 10ng/mL yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi nền tái tổ hợp ở người (hrbFGF), 2% chất bổ sung B27 không có vitamin A, 1% chất bổ sung N2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) được bao gồm). Sau đó, mỗi kháng thể kháng CD43 và kháng thể đối chứng được bổ sung 100µg/mL và được nuôi cấy. Sau đó, các dạng cầu được quan sát. Thử nghiệm giống như vậy được thực hiện bằng cách phân loại tế bào dương tính với CD43 trong mô ung thư mới của bệnh nhân.

Do đó, xác nhận được rằng việc tạo u của tế bào gốc ung thư được ức chế, so với nhóm đối chứng, là kết quả của việc dùng kháng thể kháng CD43 vào tế bào gốc ung thư dương tính với CD43 của các khối u khác nhau và mô ung thư của bệnh nhân. Kết quả này thể hiện tác dụng ức chế đáng kể sự phát sinh ung thư của tế bào gốc ung thư của kháng thể kháng CD43.

Ví dụ 10: Thử nghiệm tác dụng chống ung thư của kháng thể kháng CD43 trong các mô hình động vật ung thư khác nhau (*in vivo*)

Mô hình động vật được tạo ra bằng cách sử dụng các dòng tế bào trong đó sự biểu hiện CD43 được xác nhận trong các kết quả nêu trong ví dụ 7 và 8 và mô ung thư mới, và phương pháp là giống như trong ví dụ 4. Chuột nhắt được chỉ định ngẫu nhiên vào nhóm đối chứng (dùng PBS), và nhóm thử nghiệm, và kháng thể kháng CD43 (DNP001 mAb) được tạo ra trong ví dụ 2 được tiêm vào tĩnh mạch đuôi với lượng bằng 8mg/kg 2 lần mỗi tuần trong 3 tuần, hoặc 0,2mg/kg, 0,5mg/kg, 1mg/kg, 5mg/kg kháng CD43-saporin, DM1, MMAE, thể liên hợp duocarmyxin được tạo ra trong ví dụ 3-1 được tiêm trong màng bụng một lần mỗi tuần trong 3 tuần, vào 3 ngày sau cấy truyền tế bào ung thư.

Ví dụ 11: Thử nghiệm về sự thay đổi khả năng liên kết với tế bào máu bình thường sau khi xử lý neuraminidaza

Xác nhận được xem liệu có thay đổi về khả năng liên kết với tế bào lympho bình thường trong đó kháng thể nhận diện CD43 được biểu hiện trong máu bình thường (DFT-1) và kháng thể kháng CD43 (YG5) nhận diện CD43 đặc hiệu khối u được xử lý bằng neuraminidaza.

10ml máu được thu từ người khỏe mạnh, và 40ml dung dịch làm tan tế bào hồng cầu (Dung dịch làm tan RBC; NH₄Cl, NaHCO₃, EDTA độ pH = 8,0) được bổ

sung vào máu, và được làm tan ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Máu trong đó các tế bào hồng cầu đã được làm tan được ly tâm ở 1700 vòng/phút trong 5 phút và sau đó phần dịch nổi được loại bỏ, và nó được rửa bằng 10ml PBS hai lần. 3×10^6 tế bào lympho được tạo huyền phù trong 130 μ L dung dịch làm tan tế bào hồng cầu thu được ở trên, và 50 μ L neuraminidaza (ELPIS, Hàn Quốc) và 20 μ L chất đệm được bổ sung. Và sau đó, tế bào được cho phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 50 phút, và được rửa bằng PBS. Để xác nhận xem liệu có sự thay đổi của epitop của kháng thể nhận diện CD43 bởi neuraminidaza hay không, kháng thể DFT-1 và YG5 gắn kết FITC và PE được bổ sung vào tế bào và sau khi phản ứng ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút, tế bào này sau đó được rửa bằng 4ml PBS. Tế bào này sau đó được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và hiệu giá đối với tế bào lympho bình thường được đo.

Kết quả xác nhận hiệu giá của hai kháng thể đối với CD43 thu được ở trên (DFT-1 và YG5) được thể hiện trên Fig.15. Như được thể hiện trên Fig.15, xác nhận được rằng DFT-1 thể hiện hiệu giá cao trước khi xử lý neuraminidaza, nhưng không thể hiện như vậy sau khi xử lý neuraminidaza, trong khi đó, YG5 không biểu hiện hiệu giá trước khi xử lý neuraminidaza, nhưng lại có hiệu giá 16,16% được thể hiện sau khi xử lý neuraminidaza. Do đó, xác nhận được rằng kháng thể kháng CD43 (YG5) theo sáng chế không nhận diện epitop được sialyl hóa của protein CD43, và điều này cho thấy rằng kháng thể kháng CD43 theo sáng chế không gắn kết với tế bào bình thường và liên kết đặc hiệu với tế bào ung thư, cụ thể là, tế bào gốc ung thư.

Ví dụ 12: Thử nghiệm độ phản ứng chéo với CEACAM5 và CEACAM6

Dòng vô tính 5F1 đã biết là nhận diện protein CD43 được biết đến là nhận diện đồng thời CD43 và CEACAM6 và liên kết với vị trí được fucosyl hóa của hai protein. Thử nghiệm được rằng kháng thể kháng CD43 thể hiện độ phản ứng chéo với CEACAM5 và CEACAM6, và sự thay đổi về khả năng liên kết của kháng thể kháng CD43 nhờ sự thay đổi glycosyl hóa của epitop của CD43 bằng kifunensin và fucosidaza được thử nghiệm.

Sau khi protein tái tổ hợp rCEACAM5-hFC (Sinobiologics, Cat. No: 11077-H03H-50) và rCEACAM6-hFC (DinonA inc.) được bổ sung vào đĩa maxisorp

ELISA ở 200µL trong mỗi giếng và cho phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, nhờ đó phong bế. Kháng thể đơn dòng IgG1, YG5, DFT-1, 9A6, hoặc 8F5 (8F5: Biomaterials, 2015 Oct, 67, 32-41, 9A6: SantaCruz Biotechnology, Cat. No: sc-59899) được bổ sung ở 100ng trong mỗi giếng, một cách tương ứng, vào giếng được phủ protein rCEACAM5-hFC và rCEACAM6-hFC và được cho phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, và sau đó được rửa bằng PBS, để loại bỏ các kháng thể không liên kết. Sau đó, HRP-kháng thể dê kháng IgG chuột nhắt (Jackson) được pha loãng và được bổ sung, và nó được cho phản ứng trong 30 phút và sau đó được rửa bằng PBS, và dung dịch TMB được bổ sung ở 50µL trong mỗi giếng và nó được cho phản ứng trong 10 phút, và sau đó 50µL axit sulfuric được bổ sung để dừng phản ứng và độ hấp thụ ở 450nm được đo.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.16. Như được thể hiện trên Fig.16, chứng minh được rằng kháng thể kháng CD43 (YG5) có độ phản ứng nhỏ với các protein tái tổ hợp CEACAM5 và CEACAM6.

Ngoài ra, không có sự thay đổi về khả năng liên kết của kháng thể kháng CD43 với tế bào CEM7 được xử lý fucosidaza và kifunensin (tế bào được phân loại là có mức độ biểu hiện CD43 trên bề mặt tế bào 50% hoặc tăng hơn nữa so với tế bào ban đầu nhờ tế bào đơn lẻ nuôi cấy tế bào CCRF-CEM thu được từ ATCC (CCL-119); giống như sau đây). Kết quả này cho thấy rằng kháng thể được đề cập đến theo sáng chế (ví dụ, (kháng thể kháng CD43 (YG5)) giữ được khả năng liên kết với CD43 ngay cả trong điều kiện trong đó điều kiện đường của CD43 bị thay đổi, và điều này có nghĩa là epitop của kháng thể không độc lập với đường. Mặt khác, kháng thể CD43 thông thường, 5F1, đã được biết là thể hiện khả năng liên kết epitop phụ thuộc vào đường, và từ đó chứng minh được rằng kháng thể được đề cập đến theo sáng chế có sự khác biệt với kháng thể thông thường.

Ví dụ 13: Thử nghiệm nuôi cấy 3 chiều ở tế bào ung thư dạ dày (Thử nghiệm khối u cầu)

Dòng tế bào ung thư dạ dày, tế bào NCI-N87, được tạo ra là 80~90% của đĩa 150mm trước thử nghiệm. Tế bào NCI-N87 được tạo huyền phù bằng cách xử lý 1 x Trypsin-EDTA và sau đó được rửa. Tế bào NCI-N87 đã tạo ra được tạo lại huyền

phù với môi trường (DMEM/F12 (GIBCO), B27 (Invitrogen), EGF & bFGF (Invitrogen)) và sau đó được chia thành phần mẫu với $1 \times 10^5/2$ ml trong 6 giếng (đĩa gắn siêu thấp), và sau đó được nuôi cấy trong tủ ủ CO_2 37°C trong 5 ngày. Sau khi chụp ảnh các tế bào của mỗi giếng bằng kính hiển vi quang học, các tế bào được tách thành các tế bào đơn lẻ bằng 1 x TE $200\mu\text{L}$ và sau đó được rửa bằng PBS. 1/50 huyết thanh chuột nhất bình thường được bổ sung vào các tế bào, và nó được phong bế ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Tiếp đó, các tế bào được chia thành phần mẫu vào các ống đếm tế bào theo dòng chảy ở $100\mu\text{L}$ mỗi ống, và kháng thể kháng CD44 (eBioscience, Cat. No: 17-0441-82) và kháng thể kháng CD43 (YG5, DFT-1) được bổ sung ở $10\mu\text{L}$, $1\mu\text{L}$, một cách tương ứng, và nó được cho phản ứng ở nhiệt độ 4°C trong 25 phút. Sau khi rửa bằng cùng một phương pháp như trên, paraformaldehyt 1% (trọng lượng/thể tích) được bổ sung trong mỗi mẫu để cố định các tế bào, và sau đó kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.18a (kết quả tại thời điểm nuôi cấy) và 18b (kết quả sau khi nuôi cấy trong 5 ngày). Phần trên của mỗi hình vẽ là hình ảnh hiển vi và phần dưới là biểu đồ thể hiện kết quả của kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Như được thể hiện trên Fig.18a và Fig.18b, sự gia tăng tế bào dương tính kép CD44 và CD43 được xác nhận trong khối u cầu NCI-B87 được nuôi cấy trong 5 ngày bằng cách sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy, và xác nhận được rằng cụm khối u được tạo ra theo thời gian. Ngoài ra, xác nhận được rằng sự biểu hiện CD43 tăng lên bằng cách tạo ra khối u cầu. Kết quả này cho thấy rằng sự biểu hiện CD43 tăng lên một cách đặc trưng trong tế bào gốc khối u.

Ví dụ 14: Phương pháp ELISA đo khả năng liên kết tế bào được cải biến bằng cách sử dụng các tế bào được tạo huyền phù trong huyền phù

Phương pháp phân tích này được thiết kế dưới dạng nghiên cứu thí điểm để xác nhận khả năng liên kết của scFv hoặc IgG với các tế bào được tạo huyền phù trong huyền phù bằng cách sử dụng thí nghiệm ELISA có sự giảm tín hiệu cơ sở trong đĩa poly-D-lysine.

Phương pháp:

1. Bước gom các tế bào.

- a. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách đặt các tế bào trong ống falcon 50mL và ly tâm ở 500 x g trong 5 phút (tạo thành viên);
 - b. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách rửa các viên tế bào thu được với 10ml PBS một lần và ly tâm ở 500 x g trong 5 phút (tạo thành viên);
 - c. Các tế bào được đếm sau khi tạo lại huyền phù các tế bào với 1mL PBS (đếm tế bào);
 - d. Các tế bào được pha loãng với chất đệm phong bế (PBS + FCS 3%) (nồng độ pha loãng tế bào: 5×10^5 tế bào/giếng (10×10^6 tế bào/mL));
 - e. Nguyên liệu tế bào 50 μ L trong mỗi giếng được bổ sung vào đĩa có 96 giếng đáy hình chữ V.
2. 50 μ L chất chiết bào tương trong mỗi giếng (scFv kháng CD43) hoặc IgG1 (nồng độ cuối được mong đợi x 2 lần nguyên liệu đã cô đặc; ví dụ, khi nồng độ cuối bằng 25 μ g/mL được mong đợi, chuẩn bị 50 μ g/mL nguyên liệu) được bổ sung (theo phép phân tích sơ lược Layout, tạo ra hai lần hoặc ba lần). Các mẫu được trộn bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần một cách cẩn thận.
3. Chúng được nuôi cấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ.
 4. Chúng được ly tâm ở 500 x g trong 5 phút, để tạo thành viên các tế bào.
 5. Phần dịch nổi được loại bỏ bằng cách cho đĩa lật ra ngoài hoặc bằng cách hút.
 6. Các tế bào được rửa bằng 200 μ L chất đệm phong bế và các mẫu được trộn bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần.
 7. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.
 8. Phần dịch nổi được loại bỏ bằng cách cho đĩa lật ra ngoài một cách cẩn thận hoặc bằng cách hút.
 9. 100 μ L kháng thể liên hợp HRP kháng Flag được pha loãng theo tỷ lệ 1:1500 trong chất đệm phong bế được bổ sung vào các viên tế bào và được tạo lại huyền phù một cách cẩn thận, và được nuôi cấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút.
 10. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.
 11. Phần dịch nổi được loại bỏ bằng cách cho đĩa lật ra ngoài một cách cẩn

thận hoặc bằng cách hút.

12. Các tế bào được rửa một cách cẩn thận bằng cách bổ sung 200 μ L chất đệm phong bế và các mẫu thu được được trộn bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần.

13. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

14. Phần dịch nổi được loại bỏ bằng cách cho đĩa lật ra ngoài một cách cẩn thận hoặc bằng cách hút.

15. Các tế bào được rửa một cách cẩn thận bằng cách bổ sung 200 μ L chất đệm phong bế và các mẫu thu được được trộn bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần.

16. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

17. Các tế bào được tạo lại huyền phù một cách cẩn thận vào cơ chất SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase 80 μ L và được nuôi cấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, và sau đó phản ứng được dừng bằng HCl 1M.

18. Các mẫu 100 μ L mỗi mẫu được chuyển vào đĩa có 96 giếng tiêu chuẩn.

19. Đĩa (hấp thụ) ở 450nm được đọc.

Ví dụ 15: Phương pháp FACS đo khả năng liên kết tế bào được cải biến bằng cách sử dụng tế bào được tạo huyền phù trong huyền phù

Phép phân tích này được thiết kế là một phương pháp khác dùng cho thử nghiệm FCAS để làm giảm tín hiệu cơ sở trong đĩa poly-D-lysine và đánh giá khả năng liên kết của scFv hoặc IgG.

Phương pháp:

1. Đếm tế bào theo dòng chảy:

a. Bước gom tế bào:

i. Các tế bào được tạo thành viên trong ống falcon 50mL bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút (tạo thành viên);

ii. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách rửa các viên tế bào thu được với 10mL PBS một lần và ly tâm ở 500 x g trong 5 phút (tạo thành viên);

iii. Các tế bào được đếm sau khi tạo lại huyền phù các tế bào với 1mL PBS (đếm tế bào);

iv. Các tế bào được pha loãng với chất đệm phong bế (PBS + FCS 3%) (nồng độ pha loãng tế bào: 5×10^5 tế bào/giếng (10×10^6 tế bào/mL));

v. Nguyên liệu tế bào 50 μ L trong mỗi giếng được bổ sung vào đĩa có 96 giếng đáy hình chữ V.

2. Theo phép phân tích sơ lược Layout, các tế bào được bổ sung với 50 μ L IgG trong mỗi giếng hai lần hoặc ba lần (nồng độ cuối được mong đợi x 2 lần nguyên liệu đã cô đặc; ví dụ, khi nồng độ cuối bằng 25 μ g/mL được mong đợi, chuẩn bị 50 μ g/ml nguyên liệu), các mẫu thu được được trộn bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần.

3. Chúng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút.

4. Chất đệm phong bế 200 μ L được bổ sung.

5. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

6. Phần dịch nổi được loại bỏ bằng cách cho đĩa lật ra ngoài một cách cẩn thận hoặc bằng cách hút.

7. 200 μ L chất đệm phong bế được bổ sung và các tế bào được rửa sạch một cách nhẹ nhàng, và sau đó được trộn đều khoảng 4 lần bằng cách sử dụng ống pipet.

8. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

9. Môi trường được loại bỏ.

10. Alexa Fluor 488 đề kháng IgG người 200 μ L được pha loãng theo tỷ lệ 1:20 trong chất đệm phong bế được bổ sung vào các viên tế bào và chúng được tạo lại huyền phù một cách cẩn thận, và để trên đá trong 1 giờ nơi ánh sáng bị chặn.

11. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

12. Môi trường được loại bỏ.

13. 200 μ L chất đệm phong bế được bổ sung và các tế bào được rửa sạch một cách nhẹ nhàng, và sau đó được trộn đều bằng cách sử dụng ống pipet khoảng 4 lần.

14. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

15. Chất đệm phong bế 200 μ L được bổ sung và các tế bào được tạo lại huyền phù một cách nhẹ nhàng.

16. Đĩa được đọc bằng cách sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Ví dụ 16: Đếm tế bào theo dòng chảy scFv sử dụng chế phẩm scFv dễ tan

Ví dụ này thử nghiệm mức độ liên kết của scFv với CEM7 và tế bào U937 (ATCC® CRL1593.2™), và các scFv dễ tan được sử dụng được biểu hiện trong chu

chất *E. coli*, và được thiết kế để phân tích khả năng liên kết tế bào scFv bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Phương pháp:

Ngày 1: Cây truyền dòng vô tính

1. Đĩa nuôi cấy ban đầu:

a. 200 μ L 2YT (2 x phần chiết nấm men) + 5% (trọng lượng/thể tích) glucoza + amphotericin được nạp vào đĩa nuôi cấy có 96 giếng.

b. scFv có thể là nhóm so sánh cùng với các dòng vô tính mong muốn (kháng CD43 (mJL1) ADN mã hóa scFv: SEQ ID NO: 49; ADN mã hóa scFv Sh741-112: SEQ ID NO: 51; ADN mã hóa scFv Sh145-112: SEQ ID NO: 53; Sh146-112: SEQ ID NO: 55; hoặc ADN mã hóa scFv Sh434-112: SEQ ID NO: 57) được cấy truyền vào giếng.

2. Chúng được nuôi cấy qua đêm trong khi lắc chúng trong điều kiện 650 vòng/phút, 37°C.

Ngày 2: Biểu hiện scFv

Nuôi cấy phần chiết chu chất:

3. Theo lần sử dụng cuối của đĩa biểu hiện cấy truyền: phần chiết chu chất, một hoặc nhiều giếng mỗi mẫu có thể được cấy truyền.

a. Đĩa có 96 giếng sâu được nạp 2YT với nồng độ 1,0 mL/giếng + Amp (không có glucoza).

b. Sau khi pha loãng môi trường nuôi cấy ban đầu để có giá trị 0,1 tại OD₆₀₀, chúng được cấy truyền vào đĩa 96 giếng. Chúng được nuôi cấy trong khi lắc trong điều kiện 650 vòng/phút, 30°C trong 2~4 giờ. Định kỳ, độ đục tại OD₆₀₀ được đo bằng cách gom các mẫu. Các tế bào được nuôi cấy để có giá trị OD₆₀₀ nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,0.

4. Cảm ứng sự biểu hiện của scFv trong đĩa biểu hiện:

a. Để cảm ứng sự biểu hiện của môi trường nuôi cấy phần chiết chu chất, mỗi 100 μ L 2YT + Amp trong đó IPTG (nguyên liệu pha loãng IPTG theo tỷ lệ 1:100) được bổ sung vào các đĩa biểu hiện.

b. Chúng được nuôi cấy qua đêm kết hợp lắc trong điều kiện 650 vòng/phút

và 22°C.

Ngày 3: Tạo ra phần chiết chu chất và đếm tế bào theo dòng chảy

Chiết chu chất:

5. Tạo ra phần chiết chu chất:

a. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 2000 x g trong 10 phút.
b. Phần dịch nổi trong đĩa biểu hiện được rắc vào vật chứa chứa chất làm mất màu, và môi trường còn lại trong đĩa được loại bỏ bằng cách dựng nó lên trên khăn giấy.

c. 75µL PPB lạnh (chất đệm kali phosphat) + chất ức chế proteaza (1 viên nén trong mỗi 50mL; đầy đủ; Roche, Cat. No: 04693116001) được đưa vào mỗi giếng, và được tạo lại huyền phù bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện 1000 vòng/phút và 4°C trong 10 phút.

d. Được đưa vào mỗi giếng, và được tạo lại huyền phù bằng cách sử dụng ống pipet 4 lần, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện 1000 vòng/phút và 4°C trong 1 giờ kết hợp lắc.

e. Đĩa được ly tâm ở 3000 x g trong 10 phút.

f. Phần chiết chu chất (khoảng 270µL) được chuyển đi và đưa thiết bị lọc vào thùng (đảm bảo hướng A1 tương ứng).

i. Phần trên: đĩa lọc 96 giếng 1,2µm

ii. Phần giữa: đĩa lọc 96 giếng 100 K

iii. Phần dưới: đĩa tiêu chuẩn 96 giếng, đáy phẳng.

g. Đĩa được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 20 phút.

h. (Nếu cần) để chuẩn bị phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy, các mẫu dùng cho mỗi dòng vô tính được gom.

6. Đếm tế bào theo dòng chảy:

a. Mẫu scFv: sử dụng phần chiết chu chất

b. Gom các tế bào:

i. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách đưa vào ống falcon 50mL và ly tâm ở 500 x g trong 5 phút (tạo thành viên).

ii. Các tế bào được trút xuống bằng cách rửa các viên tế bào một lần bằng

cách sử dụng 10mL PBS và ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

iii. Các tế bào được đếm, sau khi tạo lại huyền phù các tế bào trong 1mL PBS (đếm tế bào).

iv. Các tế bào được pha loãng với $0,5 \times 10^5$ tế bào/giếng ($2,5 \times 10^6$ tế bào/mL).

v. 20 μ L nguyên liệu tế bào trong mỗi giếng được bổ sung vào đĩa có 96 giếng đáy hình chữ V.

c. 20 μ L phân chiết chu chất trong mỗi giếng được bổ sung hai lần (scFv).

Và các mẫu được trộn nhẹ nhàng bằng cách sử dụng ống pipet khoảng 4 lần.

d. Chúng được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút.

e. 180 μ L chất đệm phong bế được bổ sung.

f. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

g. Phần dịch nổi được loại bỏ bằng cách cho đĩa lật ra ngoài hoặc hút.

h. 200 μ L chất đệm phong bế được bổ sung và các tế bào được rửa sạch một cách nhẹ nhàng, và sau đó được trộn đều bằng cách sử dụng ống pipet khoảng 4 lần.

i. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

j. Môi trường được loại bỏ.

k. Các tế bào được tạo lại huyền phù một cách nhẹ nhàng bằng cách bổ sung 50 μ L 5 μ g/mL kháng thể liên hợp PE kháng Flag (BioLegend, Cat. No: 637310) vào chất đệm liên kết đã được chuẩn bị. Đĩa nên được bảo vệ tránh ánh sáng một cách tối đa, do kháng thể nhạy với ánh sáng. Chúng được để yên trên đá trong 30 phút trong điều kiện bảo vệ tránh ánh sáng.

l. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

m. Môi trường được loại bỏ.

n. 200 μ L chất đệm phong bế được bổ sung và các tế bào được rửa sạch một cách nhẹ nhàng, và sau đó được trộn đều bằng cách sử dụng ống pipet khoảng 4 lần.

o. Các tế bào được tạo thành viên bằng cách ly tâm ở 500 x g trong 5 phút.

p. 200 μ L chất đệm phong bế được bổ sung và các tế bào được tạo lại huyền phù một cách nhẹ nhàng.

q. Đĩa được đọc bằng cách sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy Guava (Merckmillipore). Kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy nên được chuẩn bị từ

trước để nhận diện huỳnh quang vàng.

Ví dụ 17: Các tính chất chức năng của kháng thể chuột kháng CD43 làm mẫu

Thử nghiệm này được thực hiện để thể hiện epitop đích thích hợp để xử lý kháng thể (JL-1). Trong thử nghiệm này, kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CD43 liên kết với epitop (chuỗi nặng: SEQ ID NO: 34; ADN mã hóa chuỗi nặng: SEQ ID NO: 33; vector biểu hiện chuỗi nặng (dựa trên pTT5): SEQ ID NO: 35; chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 37, ADN mã hóa chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 36; vector biểu hiện chuỗi nhẹ (dựa trên pTT5): SEQ ID NO: 37) được sử dụng.

Xác nhận được rằng một lượng kháng nguyên đáng kể không tách khỏi tế bào, khi kháng nguyên JL-1 (CD43) được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ. Chứng minh được rằng không có sự chênh lệch lớn về khía cạnh kích thước, khi kháng thể kháng CD43 được trộn trong chất đệm và kháng thể kháng CD43 được trộn trong phần dịch nổi của Molt-4 thực tế (dòng tế bào bạch cầu ác tính dạng lympho bào cấp tính CD43+; ATCC, CRL-1582) hoặc HL-60 (ATCC) được so sánh bằng phép phân tích thẩm tách tây.

Ngoài ra, xác nhận được rằng lượng kháng nguyên JL-1 (CD43) tuần hoàn trong huyết thanh của người bình thường không đủ để phá vỡ liên kết của kháng thể kháng CD43 với đích một cách đáng kể. Tác dụng của 50% huyết thanh người với kháng thể kháng CD43 liên kết với tế bào bạch cầu ác tính được đánh giá *in vitro* (đo IF (độ phản ứng huỳnh quang miễn dịch)). Kết quả thu được được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Tác dụng của huyết thanh người bình thường trong việc liên kết của JL-1(CD43) với tế bào bạch cầu ác tính			
Dòng tế bào	JL-1 (CD43) ug/ml	Độ phản ứng IF	
		Không có huyết thanh người	50% huyết thanh người
Molt-4	50	++	ND*
"	25	++	ND
"	12,5	++	++
"	6,25	+ / ++	+ / ++
HL-60	50	+	ND
"	25	+	ND
"	12,5	+	+ / -

"	6,25	+/-	+/-
---	------	-----	-----

* ND, không được xác định

Như được thể hiện trong bảng 2, xác nhận được rằng huyết thanh không phá vỡ sự liên kết của kháng thể kháng CD43 với tế bào Molt-4 hoặc tế bào HL-60.

Ngoài ra, thử nghiệm được rằng kháng thể kháng CD43 trần mà không được liên hợp không có tác dụng gây độc tế bào trực tiếp đối với tế bào đích đã được phân lập. Về việc này, tế bào CEM7 CD43+ (được biểu thị dưới dạng kháng nguyên CEM7 cao) và tế bào CCRF-CEM (tế bào CEM gốc (ATCC); được biểu thị dưới dạng kháng nguyên CEM7 trung bình) được bổ sung vào đĩa có 96 giếng ở lượng 40000 tế bào/giếng, một cách tương ứng, và kháng thể CD43 chuột nhắt (kháng thể đơn dòng chuột nhắt kháng CD43 được chuẩn bị từ trước) được pha loãng theo bậc và được xử lý, và tính gây độc tế bào được xác định bằng cách sử dụng Cell Titer Glo (Promega™) vào ngày nuôi cấy thứ ba. Thử nghiệm giống như vậy đối với tế bào H9K (kháng nguyên H9K thấp) biểu hiện CD43 ở nồng độ thấp được thực hiện để so sánh.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.18. Như được thể hiện trên Fig.18, chứng minh được rằng kháng thể CD43 chuột nhắt không biểu hiện tính gây độc tế bào đối với tế bào CEM7 CD43+ (Kháng nguyên CEM7 cao) hoặc tế bào CCRF-CEM (Kháng nguyên CEM trung bình; CD43 được biểu hiện ít hơn, so với tế bào CEM7).

Dòng tế bào như CEM7, CCRRF-CEM, Nalm6 (ATCC, CRL-3273) và HL-60 (ATCC, CCL-240), v.v., có mức độ biểu hiện kháng nguyên JL-1 (CD43) khác nhau riêng rẽ (từ mức độ biểu hiện cao đến biểu hiện thấp theo thứ tự được mô tả). Kháng thể kháng CD43 liên hợp saporin (tham khảo ví dụ 3-1 về cấu trúc của thể liên hợp; kháng thể kháng CD43 là kháng thể đơn dòng chuột nhắt kháng CD43 được chuẩn bị từ trước) hoặc đối chứng isotyp được xử lý ở nồng độ được pha loãng từ 20µg/mL vào mỗi tế bào (20000 tế bào), và khả năng sống sót của tế bào được đo bằng cách sử dụng Cell Titer Glom vào ngày nuôi cấy thứ ba. IgG1 chuột nhắt sử dụng làm đối chứng isotyp được sử dụng để so sánh.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.19. Như được thể hiện trên Fig.19,

quan sát thấy rằng khả năng sống sót của tế bào của CEM7 giảm nhiều nhất, khi kháng thể kháng CD43 liên hợp saporin (được biểu thị dưới dạng mJL-1 trên Fig.19) được xử lý, và sau đó đến tế bào CEM và NALM6. Tính gây độc tế bào thấp nhất (giảm khả năng sống sót của tế bào thấp nhất) trong HL-60 mà không biểu hiện đích được quan sát. Như Fig.19, kháng thể kháng CD43 liên kết với độ tổ cảm ứng sự chết của tế bào đích. Tế bào CEM7, CCRF-CEM, NALM6 và HL-60 được xử lý bằng kháng thể kháng CD43 biểu hiện hoạt tính để tiêu diệt hiệu quả các tế bào, so với mức độ biểu hiện của kháng nguyên có trong các tế bào. Saporin biểu hiện tác dụng gây độc tế bào chỉ trong trường hợp cảm ứng bên trong tế bào.

Việc nội hấp kháng thể kháng CD43 được thử nghiệm. Kháng thể chuột nhất kháng CD43 (kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CD43 được chuẩn bị từ trước) được xử lý vào các tế bào (CEM7) trong điều kiện lạnh trong 30 phút, và được chuyển đến điều kiện 37°C, và sau đó 10⁶ tế bào được gom lại ở thời gian tương ứng được biểu thị trong trục X trên Fig.20, và kháng thể thứ hai kháng IgG chuột nhất -PE (Santa cruz biotechnology, Cat. No: SC3738) được xử lý ở nhiệt độ làm lạnh trong 10 phút, và các tế bào được rửa và được cố định, và sau đó được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (tham khảo ví dụ 15).

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.20. Như được thể hiện trên Fig.20, kháng thể kháng CD43 đi vào tế bào khi liên kết với kháng nguyên, và dữ liệu tương ứng thể hiện mức độ kháng thể trên bề mặt tế bào đi vào tế bào và biến mất theo thời gian. Dữ liệu này cho thấy sự nội hấp của kháng thể kháng CD43 (cả của kháng thể chuột nhất và kháng thể được nhân hóa) đối với phân tích sự chết tế bào theo chương trình, như được tham chiếu trên Fig.19.

Mặt khác, hiện tượng kết tập cùng loại được cảm ứng bởi kháng thể kháng CD43 trong các tế bào biểu hiện kháng nguyên được thử nghiệm. Đối với thử nghiệm này, kháng thể kháng CD43 (kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CD43 được chuẩn bị từ trước) được xử lý ở nồng độ bắt đầu bằng 40µg/mL vào 300000 tế bào (CEM7, CCRRF-CEM, hoặc HL-60) và được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, CO₂ 5%, và sau đó ảnh thu được bằng cách chụp ảnh hiển vi tại thời gian đã sắp

xếp (2 giờ sau khi xử lý kháng thể). Ảnh thu được được thể hiện trên Fig.21. Fig.21 là hình ảnh thể hiện hiện tượng kết tập cùng loại được cảm ứng bởi kháng thể kháng CD43 (được biểu thị dưới dạng kháng thể kháng JL-1), chỉ ra rằng kháng thể kháng CD43 cảm ứng sự kết tập cùng loại của tế bào biểu hiện CD43 *in vitro* và mức độ kết tập cùng loại là liên quan đến mức độ biểu hiện kháng nguyên (CD43).

Ngoài ra, sự biểu hiện CD43 ở tế bào tủy xương người bình thường được thử nghiệm. Bạch cầu đơn nhân của tủy xương bình thường được nhuộm với kháng thể chuột nhất kháng CD43 (kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CD43 được chuẩn bị từ trước), và sau đó được nhuộm với PE-kháng thể dê kháng F(ab)2 IgG chuột nhất (Jackson, Cat. No: 115-035-072), và được quan sát bằng phương pháp được bộc lộ trong ví dụ 15.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.22. Trên Fig.22, biểu đồ chồng biểu thị các tế bào lympho bị giới hạn. Như được thể hiện trên Fig.22, mức độ biểu hiện thấp của CD43 khác loại được xác nhận trong các mẫu tủy xương bình thường khác nhau, bằng cách nhuộm kháng thể kháng CD43 (được biểu thị dưới dạng JL1), và cũng được xác nhận trong một vài tế bào máu ngoại vi. Nói cách khác, kết quả này thể hiện mức độ biểu hiện thấp của CD43 khác loại trong tế bào tủy xương bình thường.

Mặt khác, sự biểu hiện CD43 được đo trong tế bào CD34+CD38- (tế bào tạo máu được phân loại là tế bào biểu hiện CD43 và không biểu hiện CD38 bằng thử nghiệm với FACS; giống như sau đây) từ các mẫu tủy xương người bình thường khác nhau (Bệnh viện Đại học Quốc gia Seoul) bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy, và xác nhận được rằng thiếu sự biểu hiện protein CD43 trong tế bào gốc tạo máu và tế bào tiền thân mà tạo ra cụm trong tủy xương. Phương pháp xác nhận được mô tả đơn giản như sau: tế bào gốc tạo máu ở dây rốn được cấy truyền vào 30 con chuột nhất NSG (NOD/SCID x thiếu hụt chuỗi g chung) tại 0 ngày. Sau 12 tuần, PBL (tế bào lympho máu ngoại vi) của tất cả các con chuột nhất này được phân tích với tế bào miễn dịch được biệt hóa cuối cùng. Hệ miễn dịch của tất cả các con chuột nhất được sử dụng trong thử nghiệm được cấy ghép, và thể

liên hợp kháng thể kháng CD43 (kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CD43 được chuẩn bị từ trước)-độc tố (saporin) hoặc chất dẫn thuốc (PBS) được dùng trong 4 tuần. Tại thời điểm 4 tuần sau điều trị, sự có mặt của các tế bào miễn dịch người được phân tích trong động vật được gây miễn dịch. Để so sánh, thử nghiệm giống như vậy được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp IgG1 chuột nhất-độc tố (saporin) thay vì kháng thể kháng CD43.

Kết quả thu được được thể hiện trong bảng 3 sau:

Bảng 3

PBL 16 tuần	% tế bào sống sót (SD)			
	Tế bào B	Tế bào T	Bạch cầu đơn nhân	PMN
JL1-Độc tố	32 (11)	16 (4)	2,9 (2)	1,7 (1,2)
Isotyp-Độc tố	31 (5)	17 (6)	4,5 (4)	2,1 (1,0)
Chất dẫn thuốc	28 (8)	20 (9)	2,8 (1)	1,4 (0,4)

LN 16 tuần	% tế bào sống sót (SD)			
	Tế bào B	Tế bào T	Bạch cầu đơn nhân	PMN
JL1-Độc tố	36 (15)	31 (11)	0,3 (0,8)	1,6 (1,0)
Isotyp-Độc tố	38 (10)	39 (10)	0,1 (0,2)	0,9 (0,4)
Chất dẫn thuốc	34 (13)	37 (15)	0,2 (0,3)	1,3 (1,6)

(Trong bảng này, JL1 là CD43; PMN: bạch cầu nhân đa múi; LN: hạch lympho)

Như được thể hiện trong bảng 3, khi chuột nhất NSG được ghép với tế bào gốc tạo máu người bình thường (HSC) thu được từ tế bào gốc máu rốn và thể liên hợp kháng thể kháng CD43-độc tố (saporin) được xử lý trong 4 tuần, không quan sát thấy hiện tượng hao hụt phần tạo máu bất kỳ. Kết quả này cho thấy rằng thể liên hợp kháng thể kháng CD43-độc tố (saporin) không tiêu diệt tế bào gốc tạo máu hoặc tế bào nguyên thủy trung gian.

Việc nhuộm hóa mô miễn dịch (IHC) được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể chuột nhất kháng CD43 trong các mô người bình thường khác nhau, và kết quả thu được được thể hiện trong bảng 4 sau.

Bảng 4

Kiểu mô	# dương tính	Cường độ
Tiểu não	0/3	
Tuyến thượng thận	0/3	
Buồng trứng	0/3	

Tuyến tụy	0/3	
Tuyến cận giáp	0/3	
Tuyến yên	0/3	
Tinh hoàn	0/3	
Tuyến giáp	0/3	
Vú	0/3	
Lá lách	0/3	
Amiđan	0/3	
Tuyến ức	3/3	+++
Tủy xương	0/3	
Phổi	0/3	
Tim	0/3	
Thực quản	0/3	
Dạ dày	0/3	
Ruột non*	0/3	
Ruột kết*	0/3	
Gan	0/3	
Tuyến nước bọt	0/3	
Thận	0/3	
Tuyến tiền liệt	0/3	
* nhuộm chất nhầy		

Như được thể hiện trong Bảng 4, việc nhuộm đặc hiệu CD43 không được phát hiện ra ở mô bất kỳ khác mô tuyến ức.

Tỷ lệ biểu hiện của kháng nguyên CD43 được đo bằng cách nhuộm hai PBMC người bình thường (tế bào đơn nhân máu ngoại vi) với kháng thể chuột nhất kháng CD43 người (được biểu thị dưới dạng JL-1: (d)) (tham khảo ví dụ 15 (FACS), và kết quả được thể hiện trên Fig.23. Như được thể hiện trên Fig.23, tỷ lệ biểu hiện thấp của CD43 được xác nhận.

Kháng thể chuột nhất kháng CD43 liên hợp saporin (10 μ L/mL) được xử lý vào tế bào tủy xương bình thường từ trước (JL1+) và trường hợp không xử lý (JL1-), và mức độ hình thành cụm của các tiểu quần thể tủy xương này được đo. Tủy xương được phân lập từ các tế bào máu trắng ở người, và các tế bào CD34+ được phân lập và gom lại bằng cách phân chia thành JL-1 (CD43) dương và âm. Sau đó các tế bào đã được gom lại được đưa vào Methocult cùng với xytokin và sự hình thành cụm được đo. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.24. Như được thể hiện trên Fig.24, xác nhận được rằng cụm các tiểu quần thể tủy xương không được tạo ra trong trường

hợp xử lý kháng thể chuột nhất kháng CD43 liên hợp saporin (10 μ L/mL) từ trước (JL1+).

Mặt khác, tác dụng điều trị bệnh của bản thân kháng thể kháng CD43 (trần) và thể liên hợp kháng thể kháng CD43 liên kết độc tố-độc tố (debouganin) được thử nghiệm trong mô hình chuột nhất dị ghép ALL mắc bệnh bạch cầu bằng cách sử dụng dòng tế bào (mô hình chuột nhất mắc bệnh bạch cầu cấp tính thu được bằng cách ghép tế bào CEM7 vào chuột nhất). Kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CD43 được chuẩn bị từ trước dưới dạng kháng thể kháng CD43 được sử dụng. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.25. Trên Fig.25, kháng thể kháng CD43 được biểu thị là JL1. Trên Fig.25, (A) thể hiện kết quả trong mô hình bạch cầu CEM7 và (b) thể hiện kết quả trong mô hình NALM-6 (Dòng tế bào: NALM6 (B-ALL)), một cách tương ứng, và thử nghiệm được thực hiện trong điều kiện sau: Chuột nhất: NOD-SCID (8/nhóm); cấy truyền: 10⁷ tế bào tại 0 ngày; dùng: 15 μ g/lần tiêm + 100 μ g IgG khối i.v. 1x/tuần bắt đầu từ ngày 8; điểm cuối: trạng thái liệt. Như được thể hiện trên Fig.25, khi kháng thể kháng CD43 trần (không liên hợp) được xử lý vào mô hình chuột nhất dị ghép ALL được cấy truyền tế bào CEM7 hoặc NALM-6, bệnh này không xuất hiện hoặc bị làm chậm.

Mặt khác, mức độ biểu hiện CD43 trong nguyên bào AML chính (Bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính) và các tiểu quần thể được đo. Kết quả được thể hiện trên Fig.26. Như được thể hiện trên Fig.26, sự biểu hiện protein CD43 (được biểu thị dưới dạng JL-1) được phân tích trong nguyên bào AML tiên phát và mức độ phổ biến của các tiểu quần thể cụ thể. CD43 được biểu hiện trong khoảng 60% nhóm AML.

Ví dụ 18: Cấu trúc của kháng thể đơn dòng kháng CD43 được nhân hóa

Dựa trên trình tự dòng mầm duy trì kháng thể CD43 chuột nhất (chuỗi nặng: SEQ ID NO: 34; ADN mã hóa chuỗi nặng: SEQ ID NO: 33; vector biểu hiện chuỗi nặng: SEQ ID NO: 35, chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 37; ADN mã hóa chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 36; vector biểu hiện chuỗi nhẹ (dựa trên pTT5): trình tự vùng CDR của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 38) (CDRH1: SEQ ID NO: 111 (GYFMN); CDRH2: SEQ ID NO: 114 (RINPNNGDSFYNQKFQG); CDRH3: SEQ ID NO: 118 (EGYYGGRGYALDY); CDRL1: SEQ ID NO: 119 (RTSQDISNYLN);

CDRL2: SEQ ID NO: 121 (NTSRLHS); CDRL3: SEQ ID NO: 125 (QQSNMFPY)) và mã hóa gen kháng thể người, kiểu scFv của thư viện kháng thể tái tổ hợp được nhân hóa, trong đó trình tự từ vùng đến vùng khung làm việc được kết hợp lại, được xây dựng cấu trúc.

Thư viện kháng thể scFv đã xây dựng cấu trúc được biểu hiện và được sàng lọc bằng phương pháp biểu hiện (hiển thị) thực khuẩn thể phổ biến, và dòng vô tính dương được xây dựng cấu trúc làm thư viện con biểu hiện các biến thể được thay thế trong vùng trừ CDR hoặc một phần trình tự của vùng trong CDR, từ đó lặp lại quá trình sàng lọc.

Bằng cách lặp lại các chu kỳ khác nhau của các cấu trúc thư viện này và phương pháp biểu hiện, các trình tự biến thể của kháng thể được nhân hóa thể hiện ái lực kháng nguyên tương tự rất nhiều với dòng vô tính gốc được cố định.

Trình tự chuỗi nặng của kháng thể kháng CD43 được nhân hóa đã cố định được thể hiện trong SEQ ID NO: 40, 42, 44, và 46, và trình tự chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 48, và vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, và 83 (vùng biến đổi chuỗi nặng), và SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, và 83 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ), một cách tương ứng.

Ngoài ra, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD43 được nhân hóa đột biến từ SEQ ID NO: 83 được cải biến (vùng biến đổi chuỗi nặng) và SEQ ID NO: 95 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ) được thể hiện trong SEQ ID NO: 84 đến SEQ ID NO: 94 (vùng biến đổi chuỗi nặng) và SEQ ID NO: 96 đến SEQ ID NO: 106 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ), một cách tương ứng.

Kiểu scFv của kháng thể được tạo ra bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ thu được với GGGASGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 127) hoặc GGGGSGGGSGGGAS (SEQ ID NO: 128).

Ví dụ 19: Tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) và tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) bởi kháng thể đơn dòng kháng CD43 được nhân hóa hoặc dạng khám

Tác dụng gây chết tế bào theo chương trình (ADCC và CDC) bởi kháng thể

kháng CD43 được tạo ra (DNP001; Ví dụ 2-1-3) được thử nghiệm. Trước tiên, tế bào tác động dòng tế bào CEM7 (PBMC; tế bào đơn nhân máu ngoại vi) được nuôi cấy đồng thời với kháng thể kháng CD43 hoặc kháng thể đối chứng (IgG1 người) trong 4 giờ, và sau đó độ gây độc tế bào được đo bằng cách sử dụng Cell Titer Glo, và kết quả được thể hiện trên Fig.27A. Dòng tế bào CEM7 được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy và kháng thể kháng CD43 cùng với bộ thể thỏ (cedarlane, Cat. No: CL3051), và sau đó độ gây độc tế bào được đo bằng cách sử dụng Cell Titer Glo, và kết quả được thể hiện trên Fig.27B. Kháng thể kháng CD43 được biểu thị dưới dạng JL-1 trên Fig.27. Như được thể hiện trên Fig.27, xác nhận được rằng kháng thể kháng CD43 cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào tác động (ADCC và CDC) ở mức độ *in vitro*, so với kháng thể đối chứng IgG1 người.

Fig.28 cho thấy rằng kháng thể kháng CD43 được khử fucosyl hóa (được khử fucosyl hóa bằng cách xử lý kifunensin vào kháng thể) (được biểu thị dưới dạng JL-1) làm tăng cường hoạt tính ADCC đối với CEM7 ở mức độ *in vitro*.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện tác dụng của kháng thể kháng trần mà bản thân nó không liên kết với bất cứ thứ gì trong dòng tế bào CEM7 *in vivo*. Như được thể hiện trên Fig.29, xác nhận được rằng kháng thể kháng CD43 trần (không liên hợp) và kháng thể kháng CD43 liên hợp debouganin tăng cường khả năng sống sót của động vật cấy truyền tế bào CEM7 (mô hình bạch cầu ác tính ALL (bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính)).

Sự biểu hiện CD43 trong tiểu quần thể tế bào gốc bạch cầu ác tính (LSC) được thử nghiệm. Tủy xương của bệnh nhân mắc AML (bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính) được nhuộm với kháng thể CD45 (BD), kháng thể CD34 (BD), kháng thể CD38 (BD), kháng thể CD43 (DNP001), hoặc mIgG1 (đối chứng) với Alexa488, và mức độ biểu hiện CD43 được đánh giá bằng cách phân loại tế bào gốc bạch cầu ác tính CD34+CD38-, và chúng được so sánh với nhóm đối chứng. Kết quả được thể hiện trên Fig.30 (JL1: CD43). Như được thể hiện trên Fig.30, kháng nguyên CD43 được biểu hiện trong tiểu quần thể tế bào khởi phát bệnh bạch cầu (LSC) (CD34+/CD38-).

Số lượng trung bình của cụm được xử lý bằng kháng thể kháng CD43

được liên hợp với độc tố (saporin: SAP) (CCC) được đo *in vitro* và được thể hiện trên Fig.31. Kết quả này thể hiện tác dụng gây chết tế bào theo chương trình của AML dương tính với kháng nguyên, được bổ sung với thể liên hợp kháng thể CD43-saporin hoặc thể liên hợp IgG1 chuột nhắt-saporin vào cơ chất cụm của tế bào gốc.

Ngoài ra, tác dụng của kháng thể kháng CD43 được liên hợp với độc tố (saporin: SAP) (CCC) đến sự tăng sinh AML chính dương tính với kháng nguyên được đo *in vitro* và được thể hiện trên Fig.32. Kết quả này cho thấy rằng CCC làm giảm sự tăng sinh của AML chính. Kết quả này thu được bằng cách đưa nguyên bào AML chính vào môi trường nuôi cấy chứa thể liên hợp kháng thể CD43-saporin hoặc thể liên hợp IgG1 chuột nhắt-saporin và đo mức độ tăng sinh tế bào sau 3 ngày, và từ kết quả đó, xác nhận được rằng sự phát triển tế bào chậm đi khi được nuôi cấy trong môi trường chứa JL1-saporin (A) và tỷ lệ các tế bào chết tăng lên (B).

Như được thể hiện trên Fig.31 và Fig.32, khi được xác nhận bởi thử nghiệm cụm (Fig.31) và thử nghiệm tăng sinh (Fig.32) *in vitro*, kháng thể kháng được nhân hóa liên hợp độc tố có tính gây độc tế bào đối với AML nguyên phát dương tính với CD43.

Tác dụng ức chế đến sự phát triển tế bào ung thư AML chính bởi kháng thể liên hợp độc tố ở chuột nhắt NSG (*in vivo*) được thử nghiệm. 5×10^7 tế bào tủy xương được thu gom từ bệnh nhân AML CD43+, và chúng được tiêm trong tĩnh mạch vào 30 con chuột nhắt NSG được chiếu xạ và sau 8 tuần, thể liên hợp kháng thể CD43-khảm-debougianin (DB) (được biểu thị dưới dạng JL1-DB), thể liên hợp hIgG1-DB (được biểu thị dưới dạng Isotyp-DB), hoặc PBS (chất dẫn thuốc) được dùng cho các con chuột nhắt này ở liều $45 \mu\text{g}$ mỗi tuần trong 4 tuần. Máu, tủy xương và lá lách sau đó được gom từ các con chuột nhắt đó, và hiện tượng ghép và sản sinh khối u được quan sát. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.33. Như được thể hiện trên Fig.33, sự phát triển của tế bào ung thư AML nguyên phát được ức chế bằng kháng thể kháng được nhân hóa kháng CD43 liên hợp độc tố ở chuột nhắt NSG ở mức độ *in vivo*.

Fig.34 và Fig.35 xác nhận rằng các kháng thể được nhân hóa/được cải biến tối ưu hóa khác nhau thể hiện profin liên kết tương đương so với kháng thể CD43 mẫu (chuột nhắt). Tế bào CEM7 được nhuộm với kháng thể CD43 mẫu ban đầu

(ART140 JL1; kháng thể chuột nhất kháng CD43; chuỗi nặng: SEQ ID NO: 34; chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 37) và 3 loại kháng thể được nhân hóa (257-10 (SEQ ID NO: 93 & 105); 456-D10 (SEQ ID NO: 94 & 106); Combo A (SEQ ID NO: 2 & 4)), từ đó đo cường độ huỳnh quang, và kết quả được thể hiện trên Fig.34. Như được thể hiện trên Fig.34, xác nhận được rằng "*Combo A*" đã cải biến thể hiện profin tốt nhất, nhưng tất cả các kháng thể thử nghiệm khác thể hiện mức độ gây độc tế bào đáng kể trong tế bào CEM7. Để thử nghiệm sự nội hấp tế bào của kháng thể được liên hợp với vật liệu gây độc tế bào, 3 loại kháng thể được nhân hóa được tạo phức từ trước với kháng IgG người-saporin được xử lý vào tế bào CEM7, và độ gây độc tế bào được đo sau 3 ngày, và được thể hiện trên Fig.35. Như được thể hiện trên Fig.35, khi thể liên hợp của 3 loại kháng thể được cải biến và saporin được sử dụng, độ gây độc tế bào cao một cách đáng kể.

Như được thể hiện trên Fig.34 và Fig.35, mức độ liên kết và mức độ gây độc tế bào của các biến thể kháng thể kháng CD43 được nhân hóa khác nhau là bằng nhau, so với kháng thể CD43 chuột (ART140 JL1) *in vitro*. Synagis (Medimmune Company) là kháng thể đơn dòng được nhân hóa (IgG) đối với thể quyết định kháng nguyên trên vị trí kháng nguyên A của protein F của RSV được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Fig.37a và Fig.37b thể hiện một số biến thể kháng thể kháng CD43 được nhân hóa (tham khảo Fig.36) liên kết với kháng nguyên CD43 trên bề mặt tế bào, so với kháng thể CD43 chuột (ART140 JL1) bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Tế bào U937 được sử dụng làm đối chứng âm trong đó sự biểu hiện của kháng nguyên CD43 trên bề mặt bị thiếu hụt.

Fig.38a và Fig.38b cho thấy rằng một số biến thể kháng thể kháng J CD43 được nhân hóa (tham khảo Fig.36) liên kết với kháng nguyên CD43 trên bề mặt tế bào, so với kháng thể CD43 chuột (ART140 JL1) bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA). Tế bào U937 được sử dụng làm đối chứng âm trong đó sự biểu hiện của kháng nguyên CD43 trên bề mặt là thiếu hụt.

Fig.39a và Fig.39b cho thấy rằng biến thể kháng thể kháng CD43 được nhân hóa nhờ đột biến Quikchange (Combo A (SEQ ID NO: 91 (vùng biến đổi chuỗi

nặng); SEQ ID NO: 103 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ)), Combo B (SEQ ID NO: 91 (vùng biến đổi chuỗi nặng); SEQ ID NO: 103 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ)), Combo C (SEQ ID NO: 85 (vùng biến đổi chuỗi nặng); SEQ ID NO: 97 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ))) liên kết với CD43 trên bề mặt tế bào, so với kháng thể CD43 chuột (ART140 JL1) và khung gốc vòng 3 bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Các hình vẽ từ Fig.41a đến Fig.41c cho thấy rằng biến thể kháng thể kháng CD43 được nhân hóa nhờ đột biến Quikchange (Combo A, Combo B, Combo C) liên kết với kháng nguyên JL1 trên bề mặt tế bào, so với kháng thể CD43 chuột (ART140 JL1) và khung gốc vòng 3.

Ví dụ 20: Tạo ra kháng thể cải biến loại bỏ gốc axit amin của vùng được glycosyl hóa của kháng thể được nhân hóa

Phát hiện ra rằng có trình tự axit amin có khả năng glycosyl hóa trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 105) của kháng thể kháng CD43 được nhân hóa thu được từ ví dụ 18 (257-10; bao gồm SEQ ID NO: 93 (vùng biến đổi chuỗi nặng) + SEQ ID NO: 105 (vùng biến đổi chuỗi nhẹ)), và kháng thể đột biến được tạo ra để loại bỏ nó.

Do việc glycosyl hóa epitop chuỗi nhẹ (vùng biến đổi chuỗi nhẹ) có khả năng lớn gây ra các tác động tiêu cực đến khả năng liên kết kháng nguyên và các tính chất vật lý của kháng thể, và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất phân hủy trong quá trình sản xuất hàng loạt sau đó, nên khả năng phát triển kháng thể để làm tác nhân trị liệu gia tăng bằng cách thay thế axit amin có khả năng glycosyl hóa tiềm tàng thành axit amin khác.

Vị trí thứ 50 của gốc axit amin asparagin (Asn, N) và vị trí thứ 52 của gốc axit amin serin (Ser, S) được chọn lọc làm axit amin có khả năng glycosyl hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 105) của kháng thể kháng CD43 được nhân hóa (tham khảo Fig.43). Kháng thể đột biến được tạo ra bằng cách thay thế vị trí thứ 50 của gốc axit amin asparagin (Asn, N) của SEQ ID NO: 8 thành glutamin (Gln, Q) hoặc alanin (Ala, A), và/hoặc thay thế vị trí thứ 52 của gốc axit amin serin (Ser, S) thành alanin (Ala, A), và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đột biến thu được như trên được thể hiện trong SEQ ID NO: 107 (S52A), 108 (N50Q), và 109 (N50A).

SEQ ID NO 107 (S52A)

DTQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKL
LIYNTARLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTF
GQGTELEIK

SEQ ID NO 108 (N50Q)

DTQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKL
LIYQTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTF
GQGTELEIK

SEQ ID NO 109 (N50A)

DTQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKL
LIYATSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTF
GQGTELEIK

Kháng thể typ IgG1 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO: 93) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đã cải biến thu được 55 được tạo ra, và kỹ thuật thẩm tách tây được thực hiện bằng cách sử dụng Concanavalin A-HRP liên kết với vùng được glycosyl hóa (Sigma-Aldrich).

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.44. Như được thể hiện trên Fig.44, xác nhận được rằng Concanavalin A liên kết với tất cả các vùng chuỗi nhẹ và vùng chuỗi nặng trong kháng thể trong đó axit amin của vùng được glycosyl hóa không được cải biến (bao gồm SEQ ID NO: 93 và SEQ ID NO: 105; kiểu đại), nhưng sự liên kết trong vùng chuỗi nhẹ không xuất hiện ở ba loại kháng thể được cải biến (scFv). Kết quả này có nghĩa là việc glycosyl hóa vùng chuỗi nhẹ của kháng thể được loại bỏ.

Ngoài ra, bằng cách đo khả năng liên kết của kháng thể với tế bào dương tính với CD43, tế bào CEM7, khả năng liên kết kháng nguyên được phân tích. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.45. Như được thể hiện trên Fig.45, kháng thể đã cải biến thể hiện khả năng liên kết kháng nguyên tương đương với kháng thể kiểu đại.

Kháng thể khảm (DNP001) và kháng thể được nhân hóa đã cải biến loại bỏ sự glycosyl hóa (vùng biến đổi chuỗi nặng; SEQ ID NO: 93; vùng biến đổi chuỗi

nhẹ: SEQ ID NO: 109) liên kết với tế bào dương tính với kháng nguyên (CD43), tế bào CEM7, và chúng được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.46. Như được thể hiện trên Fig.46, xác nhận được rằng kháng thể được nhân hóa đã cải biến thể hiện khả năng liên kết tế bào biểu hiện CD43 tăng cường hơn so với kháng thể khảm.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

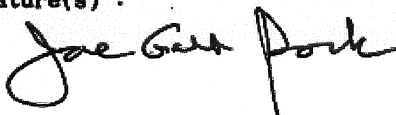
INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : Seong Hoe Park

Pathology Department, Seoul National University College of Medicine
28 Chongho-Ku Yongon-Dong, Seoul, 110-799, Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : H-JL1	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00010
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ A scientific description ☒ A proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on January 13, 1997	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Cell Line Research Foundation Director Address : Cancer Research Institute Seoul Nat'l Univ. College of Medicine 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Signature(s) :  Date : 1997. 1.14

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm:

CDR1H nêu trong SEQ ID NO: 111,

CDR2H nêu trong SEQ ID NO: 114,

CDR3H nêu trong SEQ ID NO: 118,

CDR1L nêu trong SEQ ID NO: 119,

CDR2L nêu trong SEQ ID NO: 122, 123, hoặc 124, và

CDR3L nêu trong SEQ ID NO: 125.

2. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:

CDR1H nêu trong SEQ ID NO: 111,

CDR2H nêu trong SEQ ID NO: 114,

CDR3H nêu trong SEQ ID NO: 118,

CDR1L nêu trong SEQ ID NO: 119,

CDR2L nêu trong SEQ ID NO: 124, và

CDR3L nêu trong SEQ ID NO: 125.

3. Kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 6; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 107, 108, hoặc 109.

4. Thẻ tiếp hợp bao gồm:

kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1;

và

ít nhất một vật liệu được chọn từ nhóm gồm vật liệu gây độc tế bào và vật

liệu đánh dấu.

5. Thể tiếp hợp theo điểm 4, trong đó vật liệu gây độc tế bào là ít nhất một vật liệu được chọn từ nhóm bao gồm rixin, saporin, gelonin, momordin, debouganin độc tố bạch hầu, độc tố *pseudomonas*, các đồng vị phóng xạ, duocarmyxin, monomethyl auristatin E (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF), N2'-deaxetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)maytansin (DM1), và pyrolobenzodiazepin (PBD) dime.

6. Dược phẩm chứa:

kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

7. Dược phẩm chứa:

thể tiếp hợp theo điểm 5, và

chất mang dược dụng.

8. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư, trong đó dược phẩm này chứa:

kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

chất mang dược dụng.

9. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư, trong đó dược phẩm này chứa:

kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

chất mang dược dụng;

trong đó bệnh ung thư là bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

10. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này còn chứa vật liệu gây độc tế bào.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó vật liệu gây độc tế bào là ít nhất một vật liệu được chọn từ nhóm bao gồm rixin, saporin, gelonin, momordin, debouganin, độc tố bạch hầu, độc tố *pseudomonas*, các đồng vị phóng xạ, duocarmyxin, monomethyl

auristatin E (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF), N2'-deaxetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)maytansin (DM1), và pyrolobenzodiazepin (PBD) dime.

12. Dược phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, trong đó dược phẩm này chứa:

kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

chất mang dược dụng.

13. Dược phẩm để ức chế tế bào gốc ung thư, trong đó dược phẩm này chứa:

kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

chất mang dược dụng;

trong đó tế bào gốc ung thư là tế bào gốc ung thư trong bệnh máu ác tính hoặc bệnh ung thư thể rắn.

FIG. 1

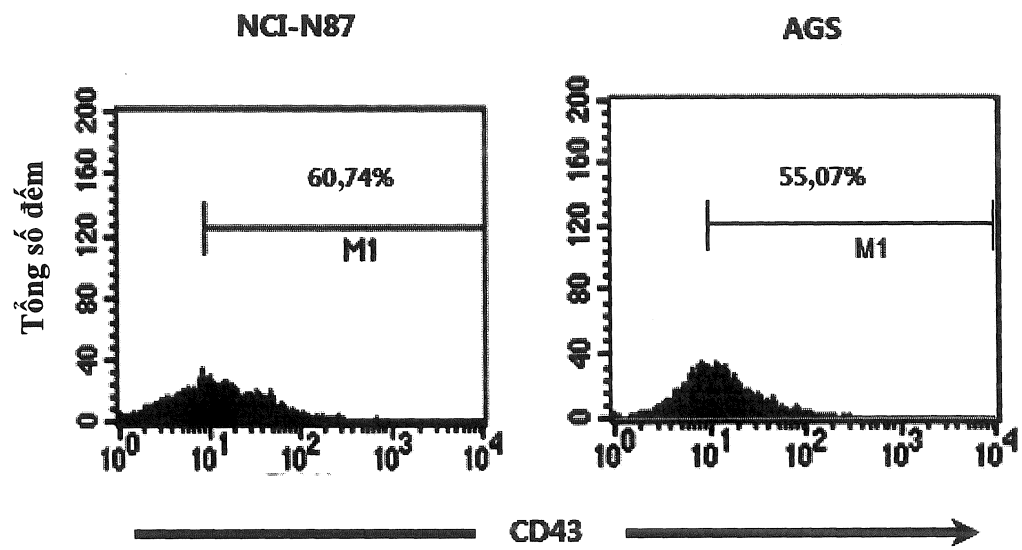


FIG. 2a

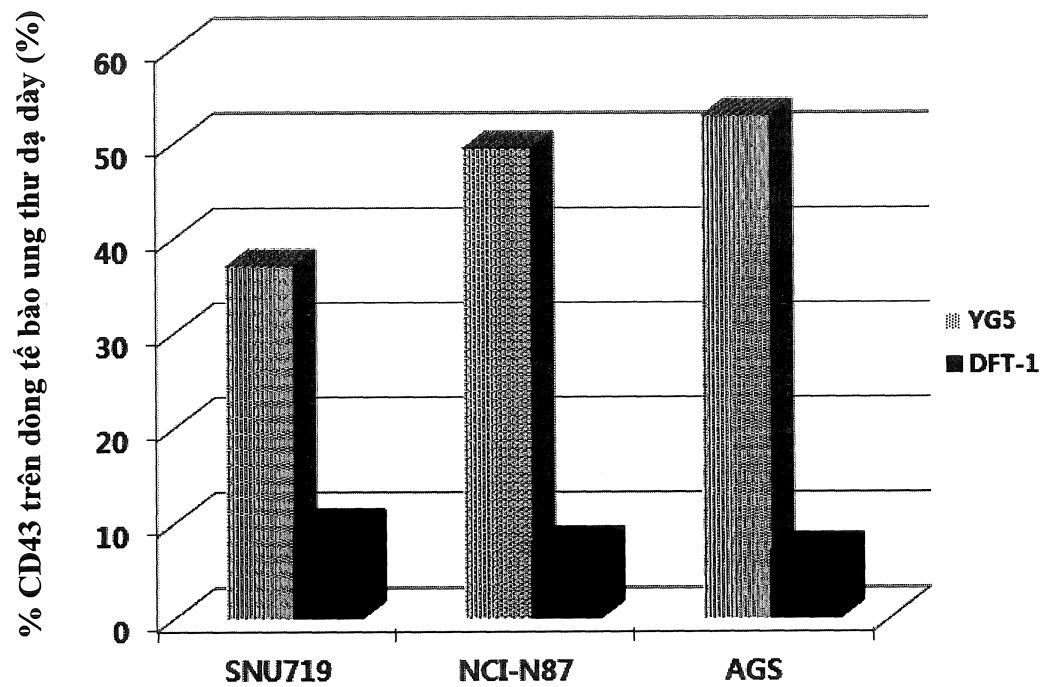


FIG. 2b

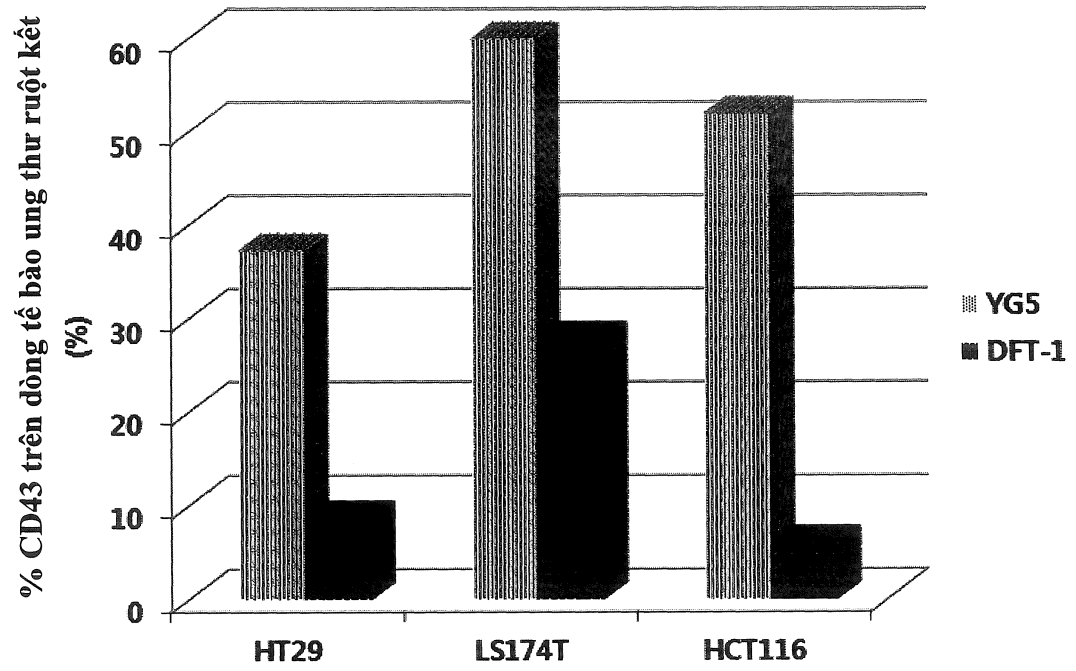


FIG. 2c

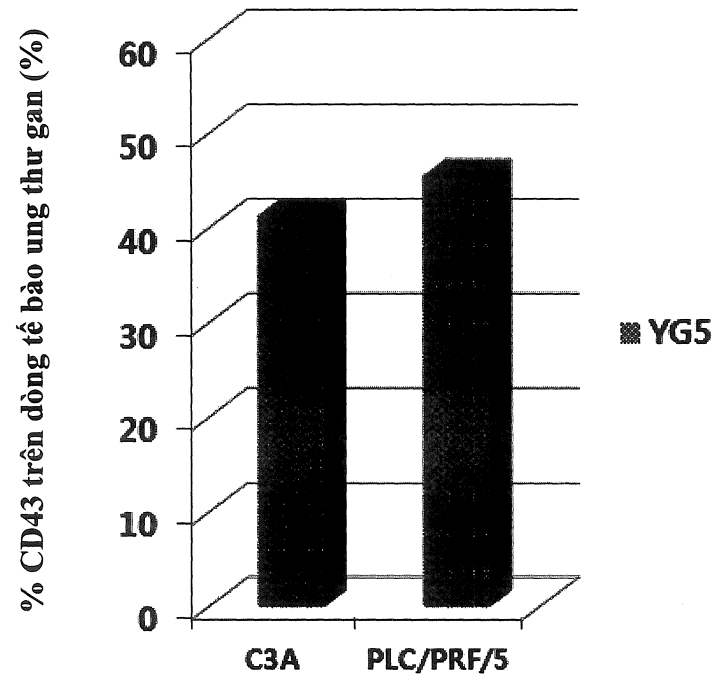


FIG. 3

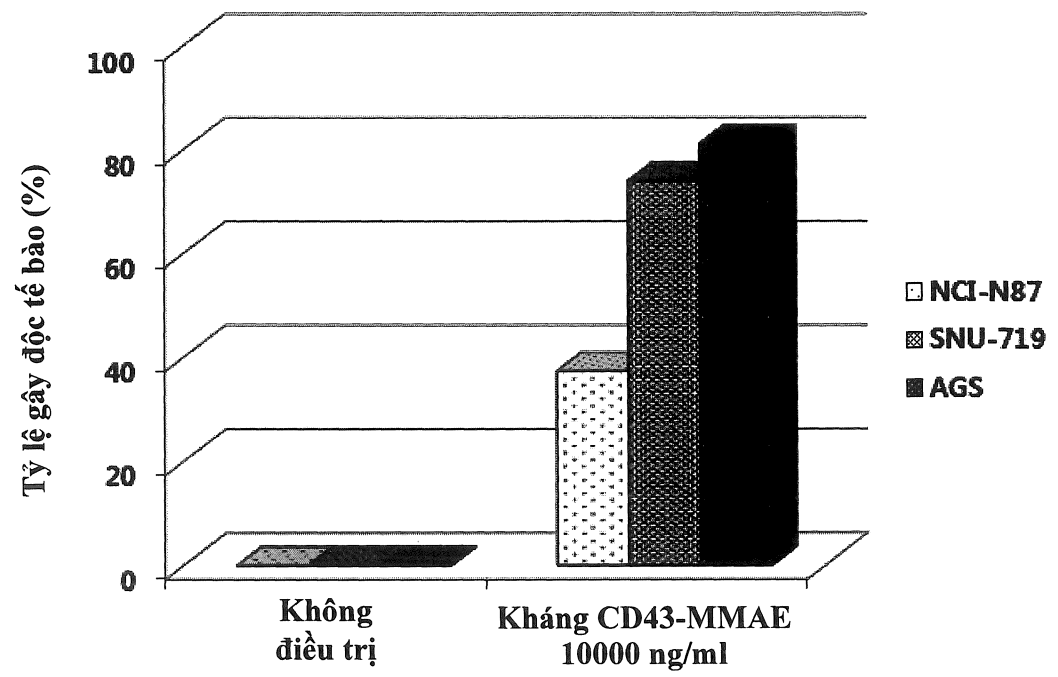


FIG. 4

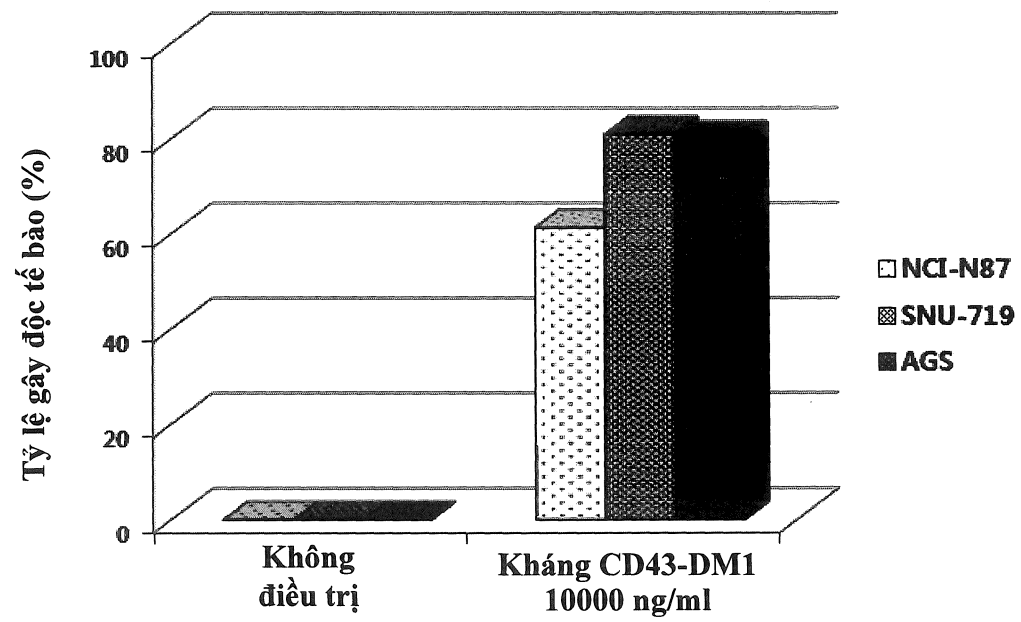


FIG. 5

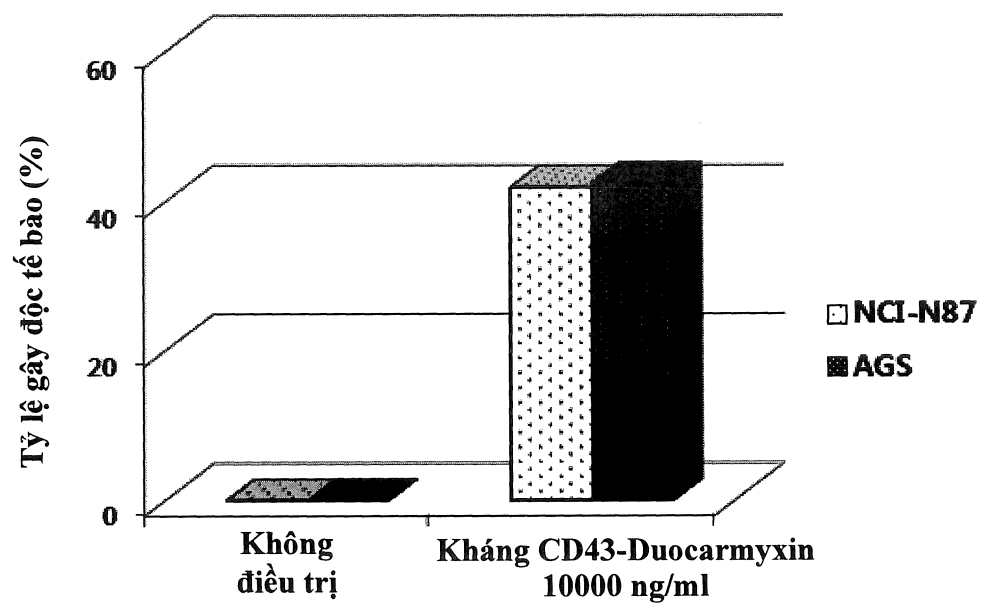


FIG. 6

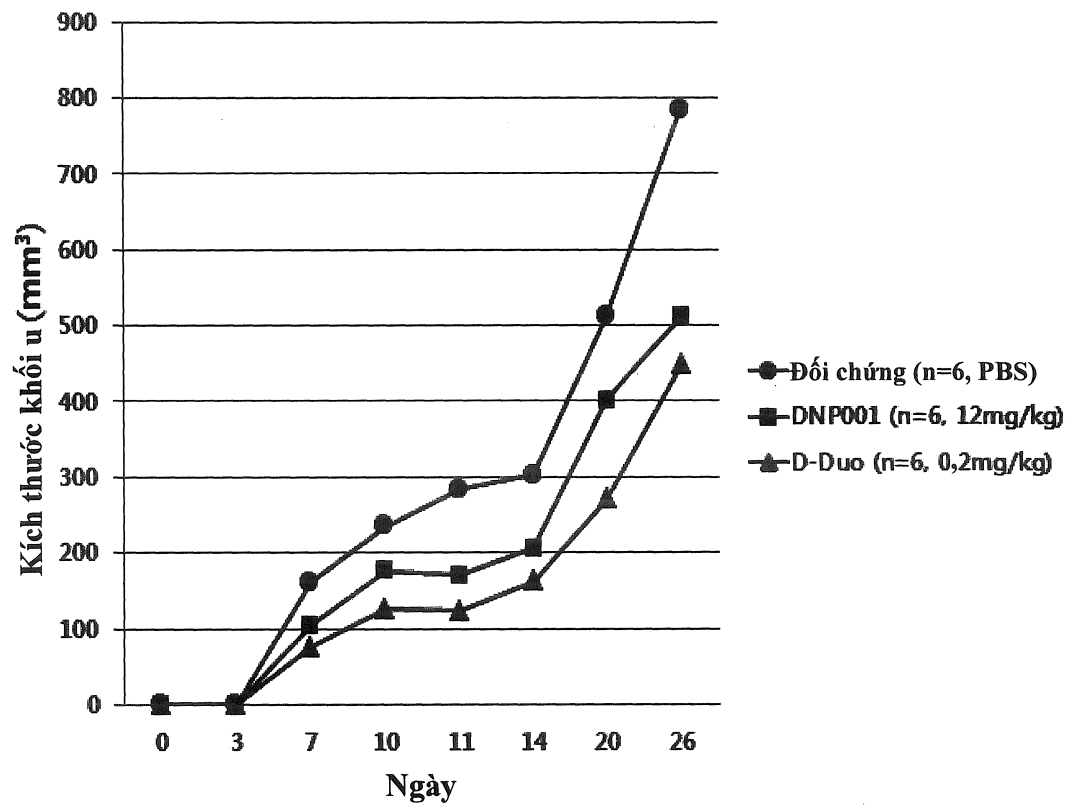


FIG. 7

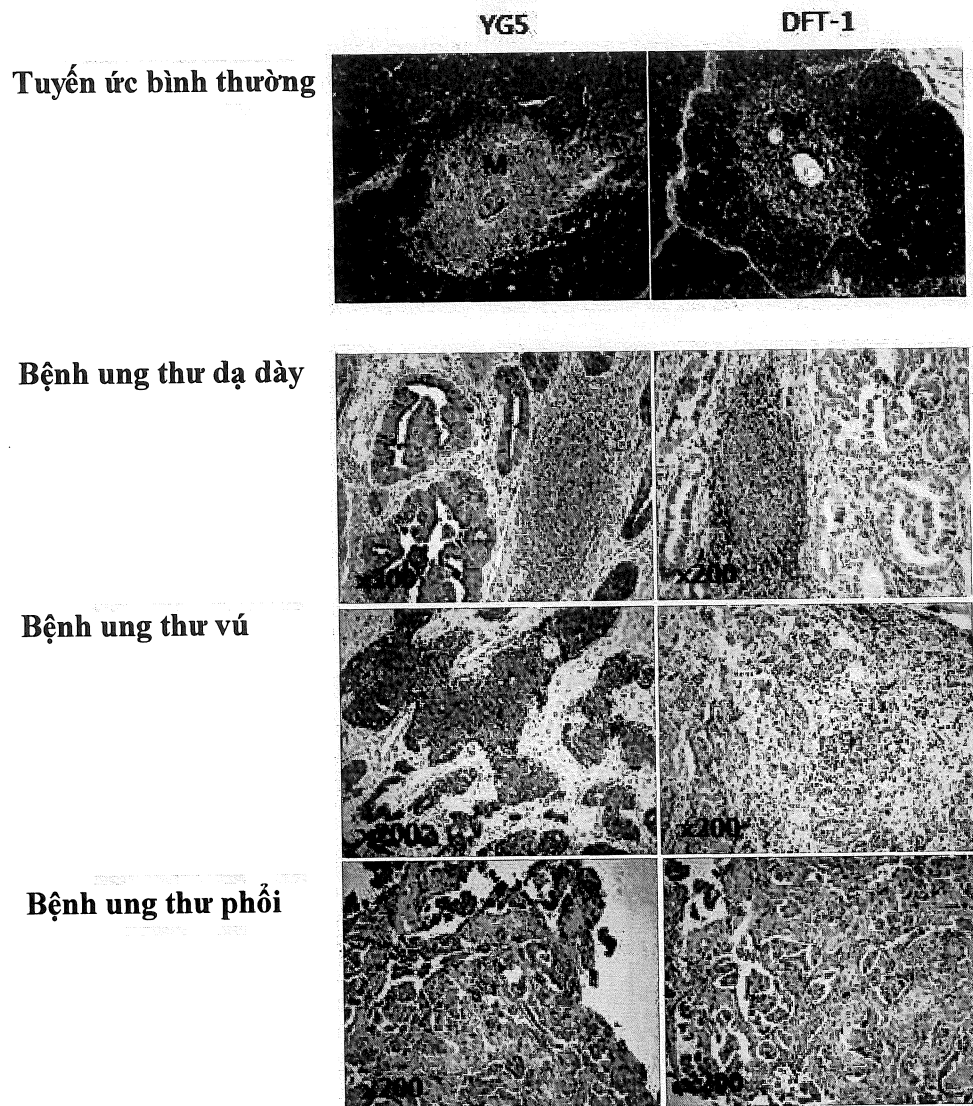


FIG. 8

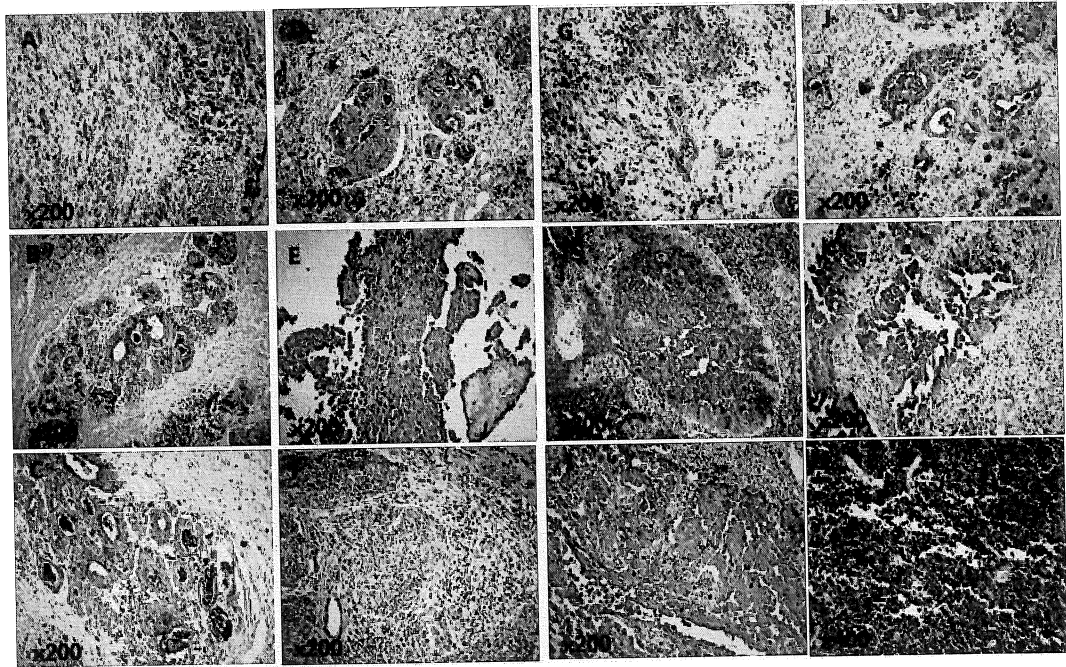


FIG. 9

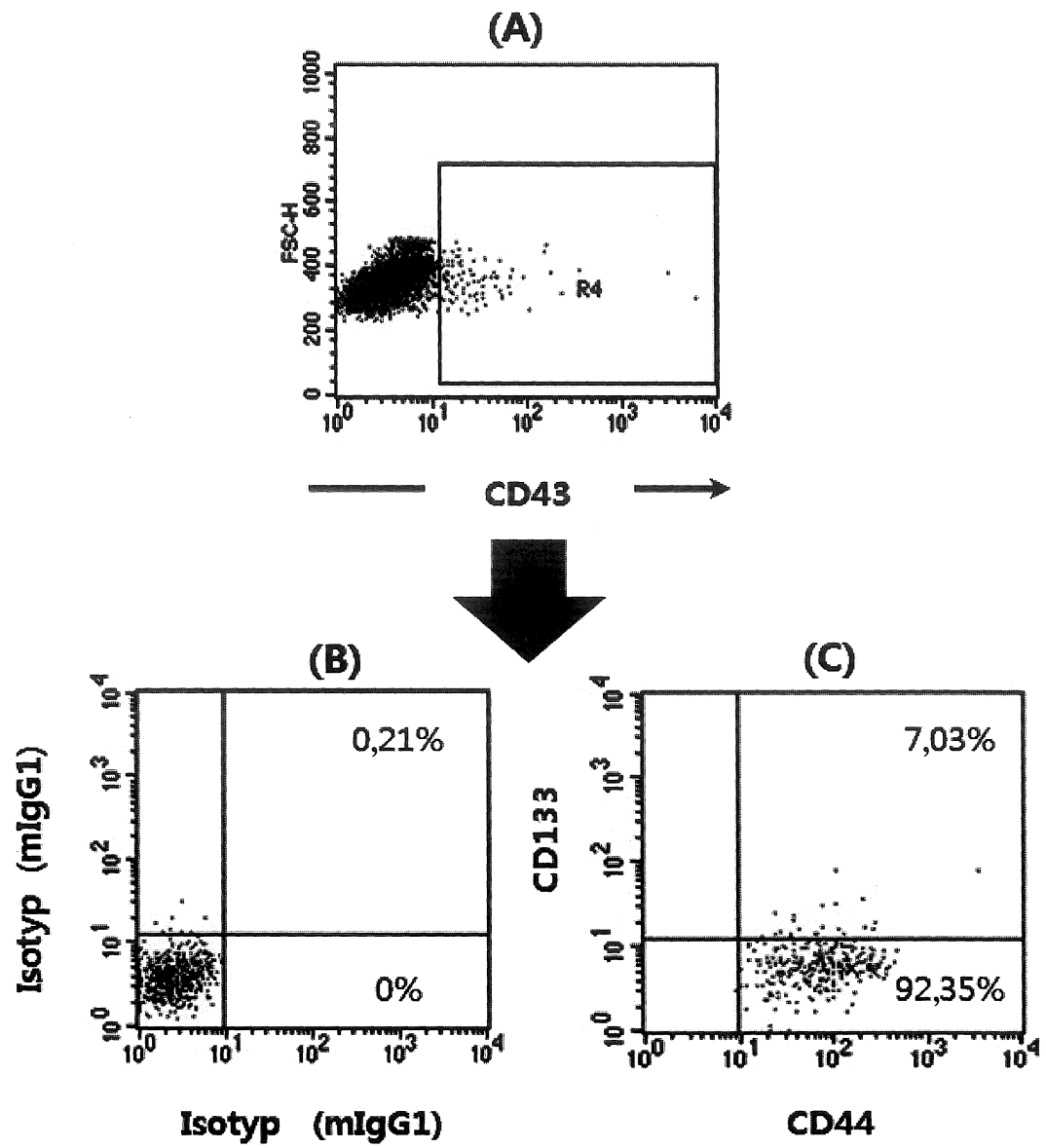


FIG. 10



FIG. 11

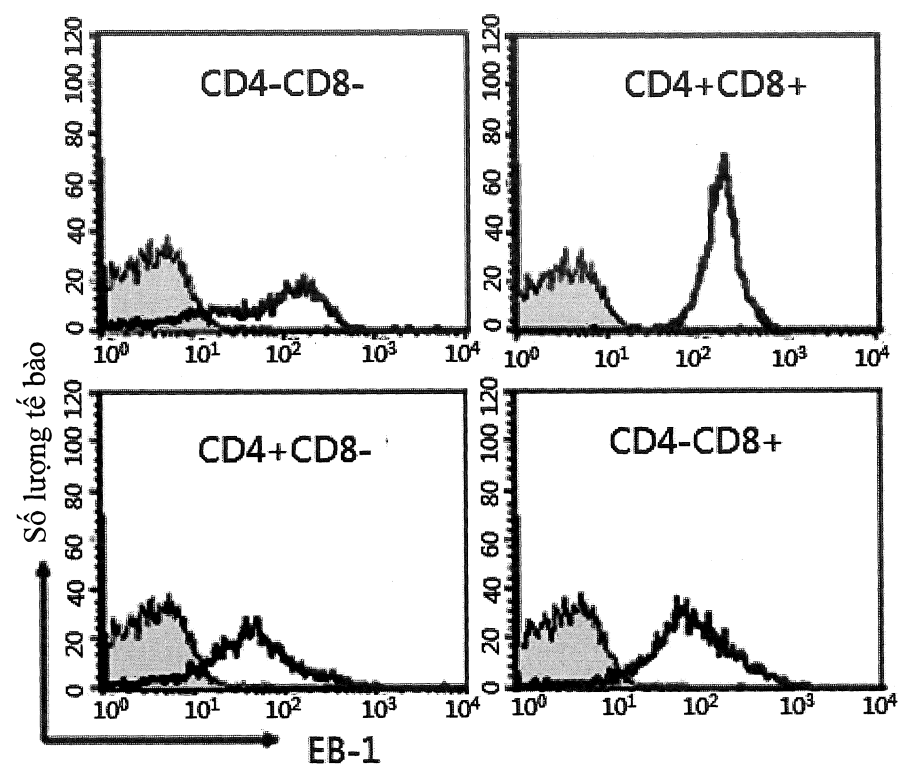


FIG. 12

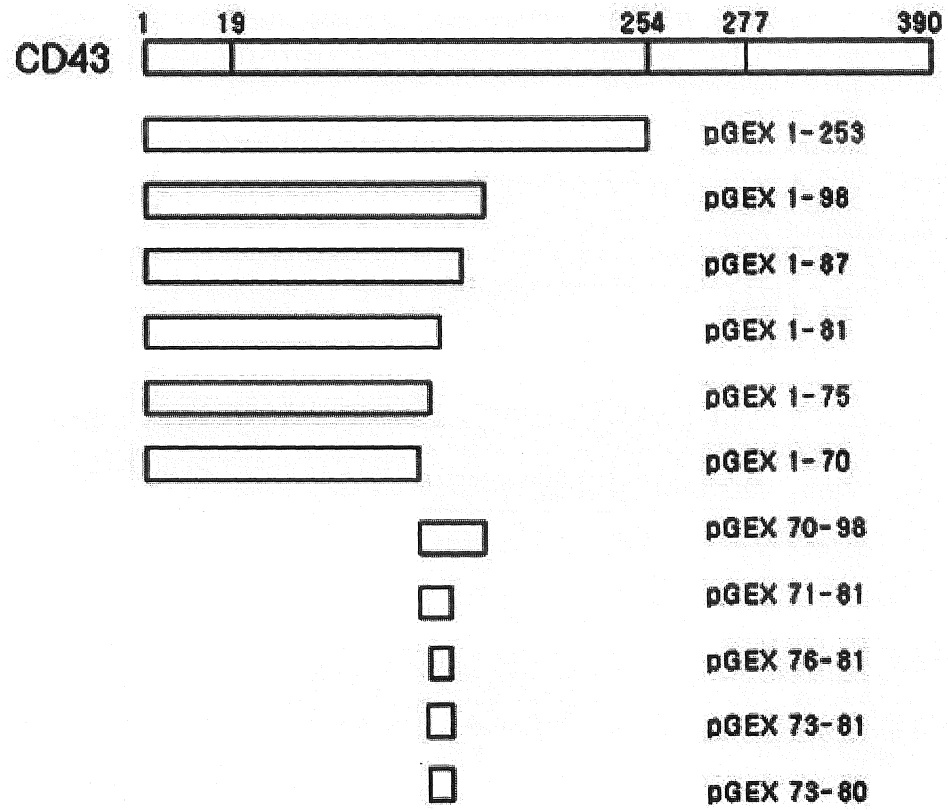


FIG. 13

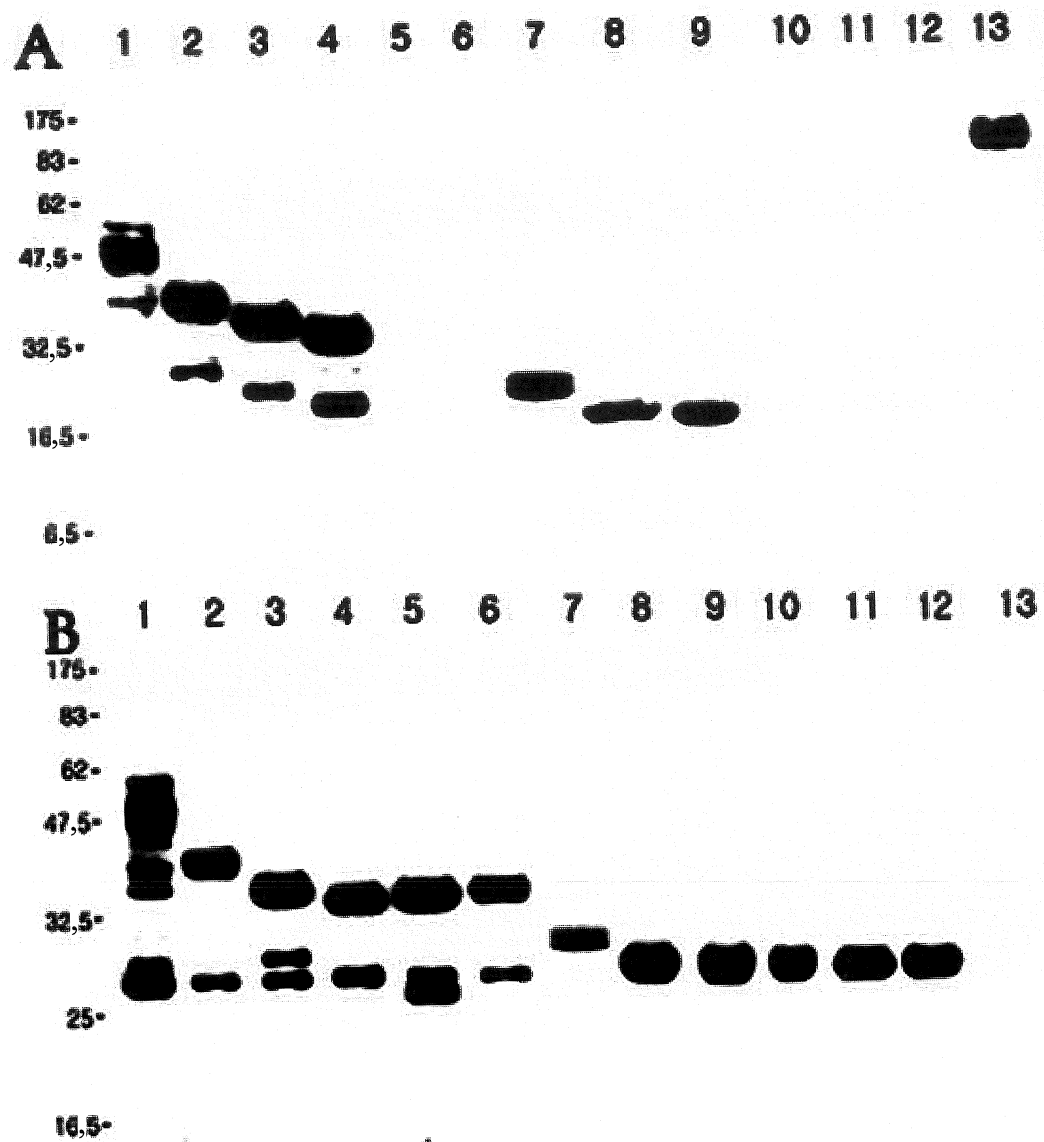


FIG. 14

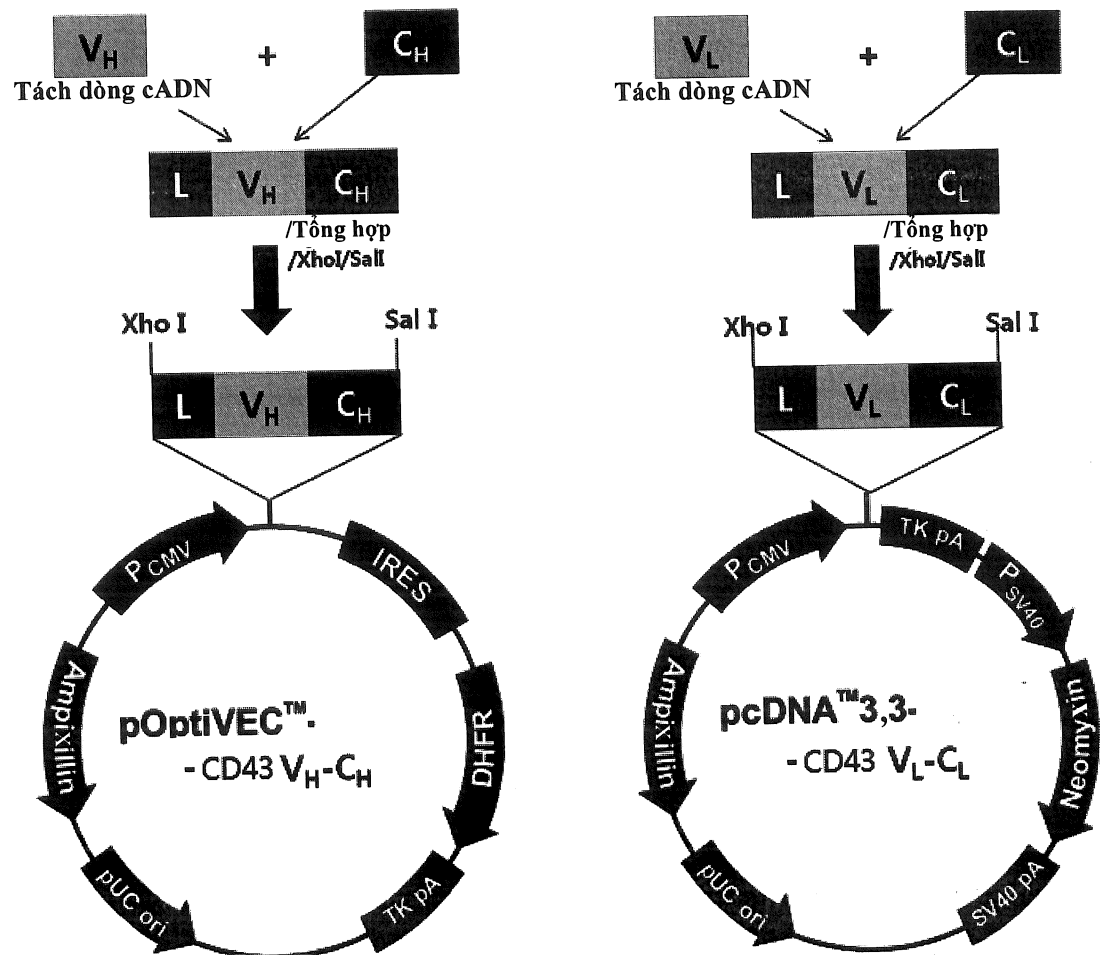


FIG. 15

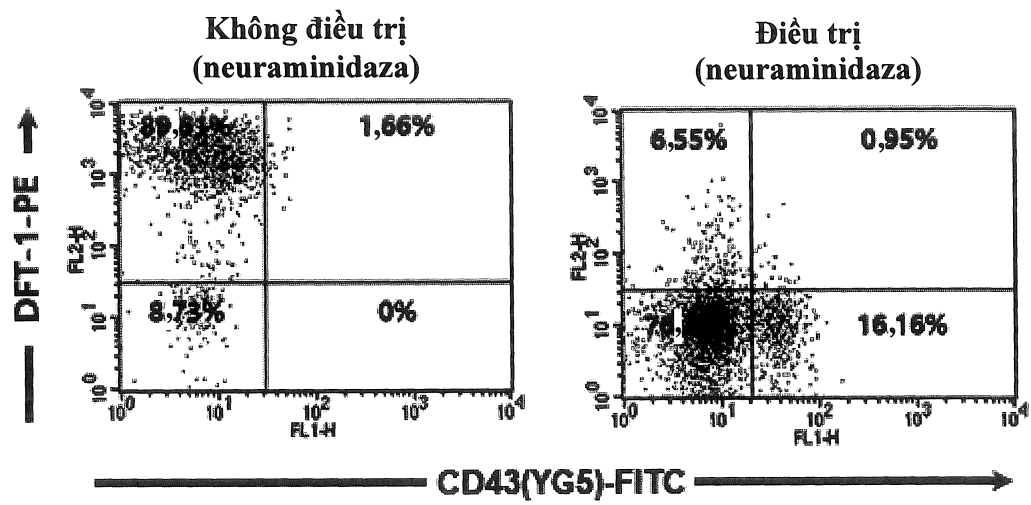


FIG. 16

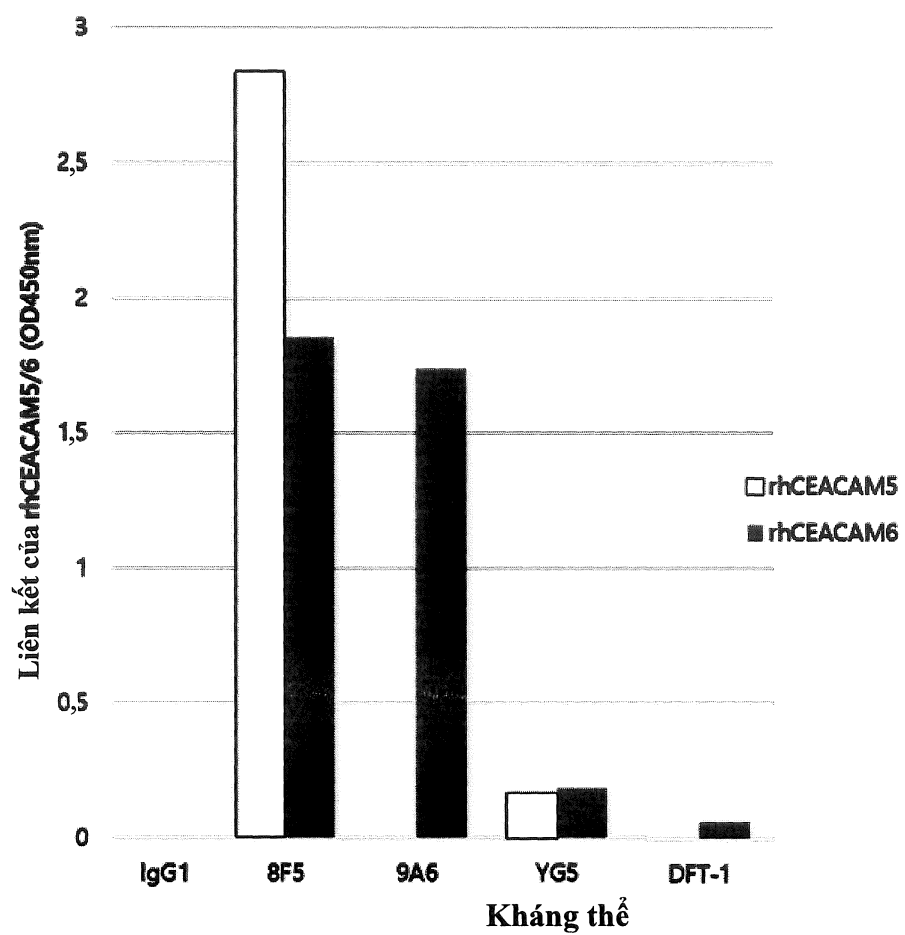


FIG. 17a

0 giờ

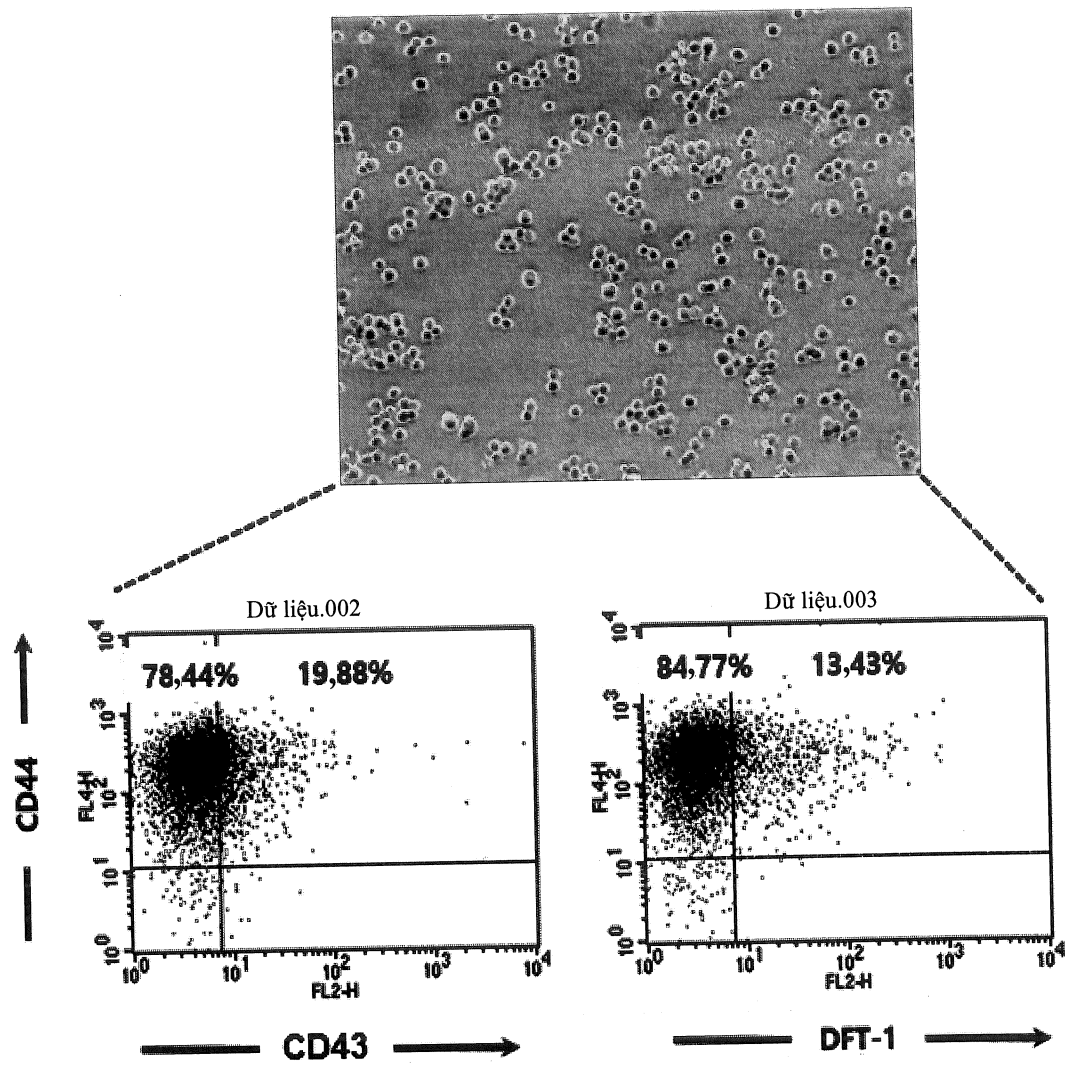
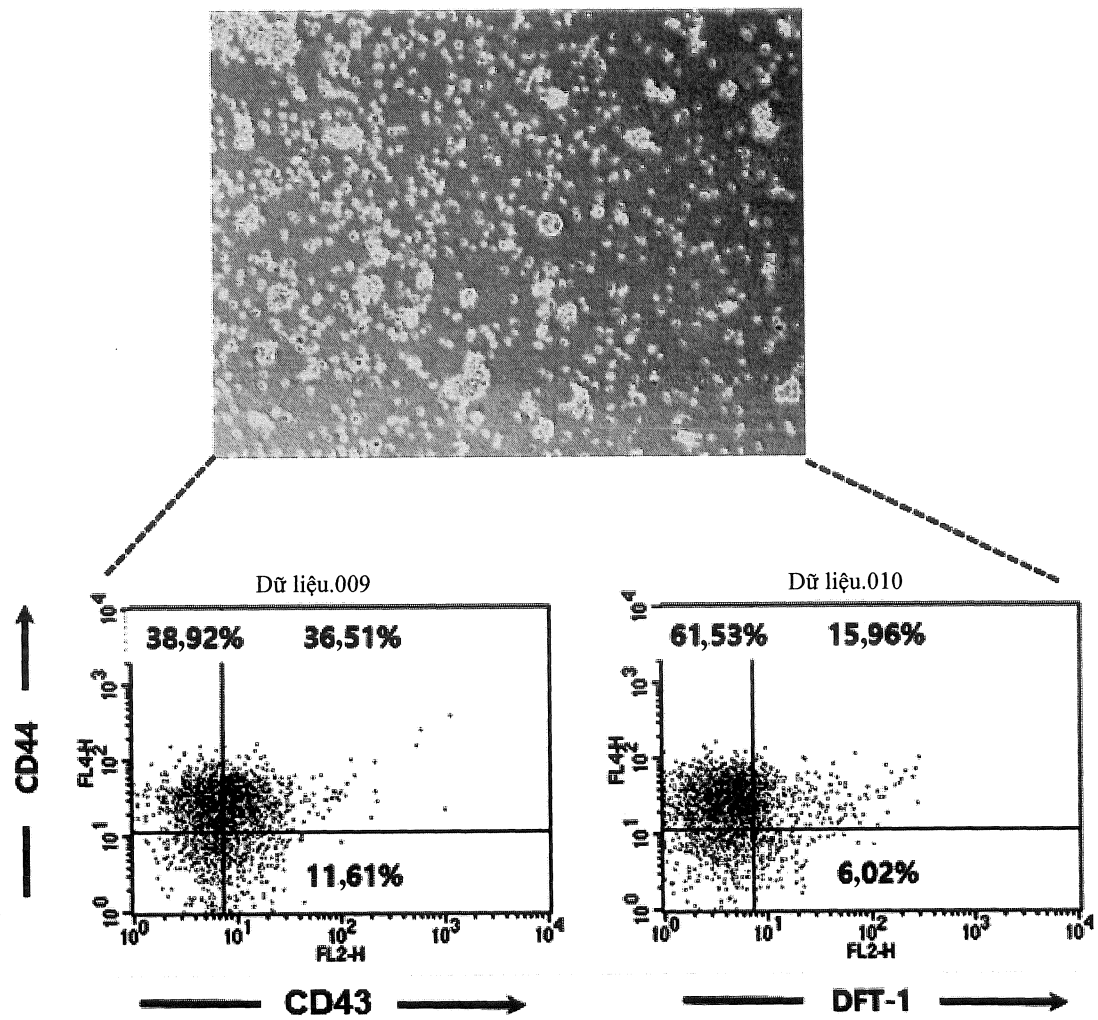


FIG. 17b

5 ngày

Thử nghiệm gây độc tế bào của các dòng tế bào với Ab kháng CD43 ở chuột nhắt

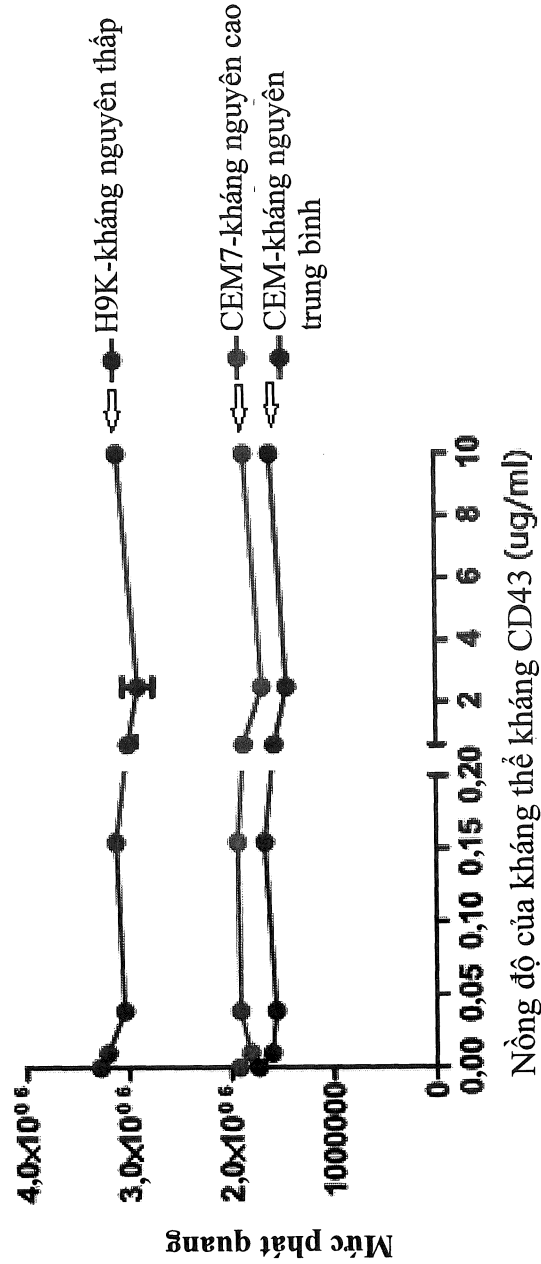


FIG. 18

Thử nghiệm gây độc tế bào của JL-1 chuột nhắt-Saponrin ở bốn dòng tế bào

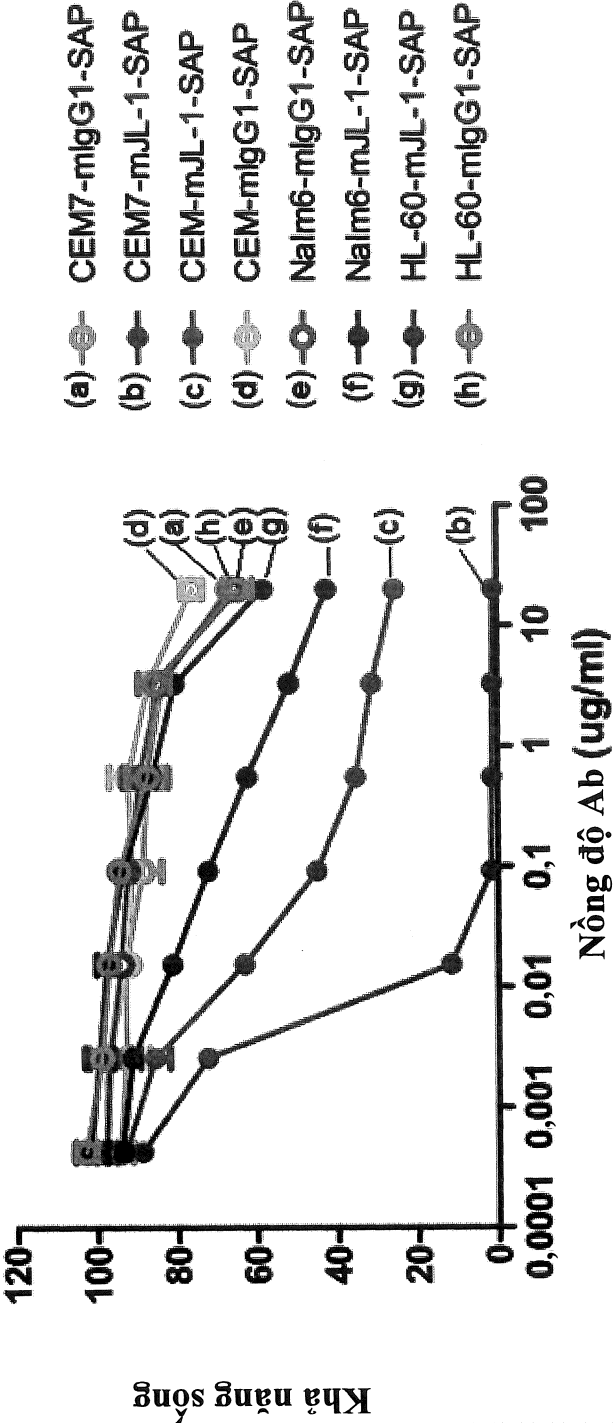


FIG. 20

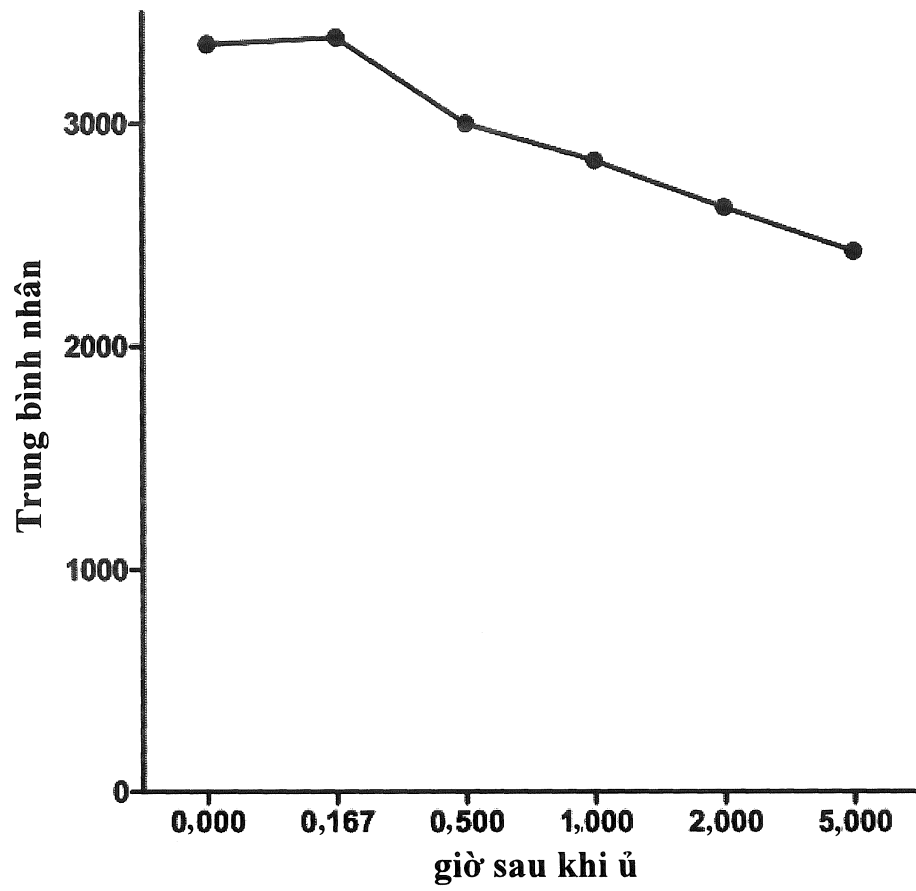
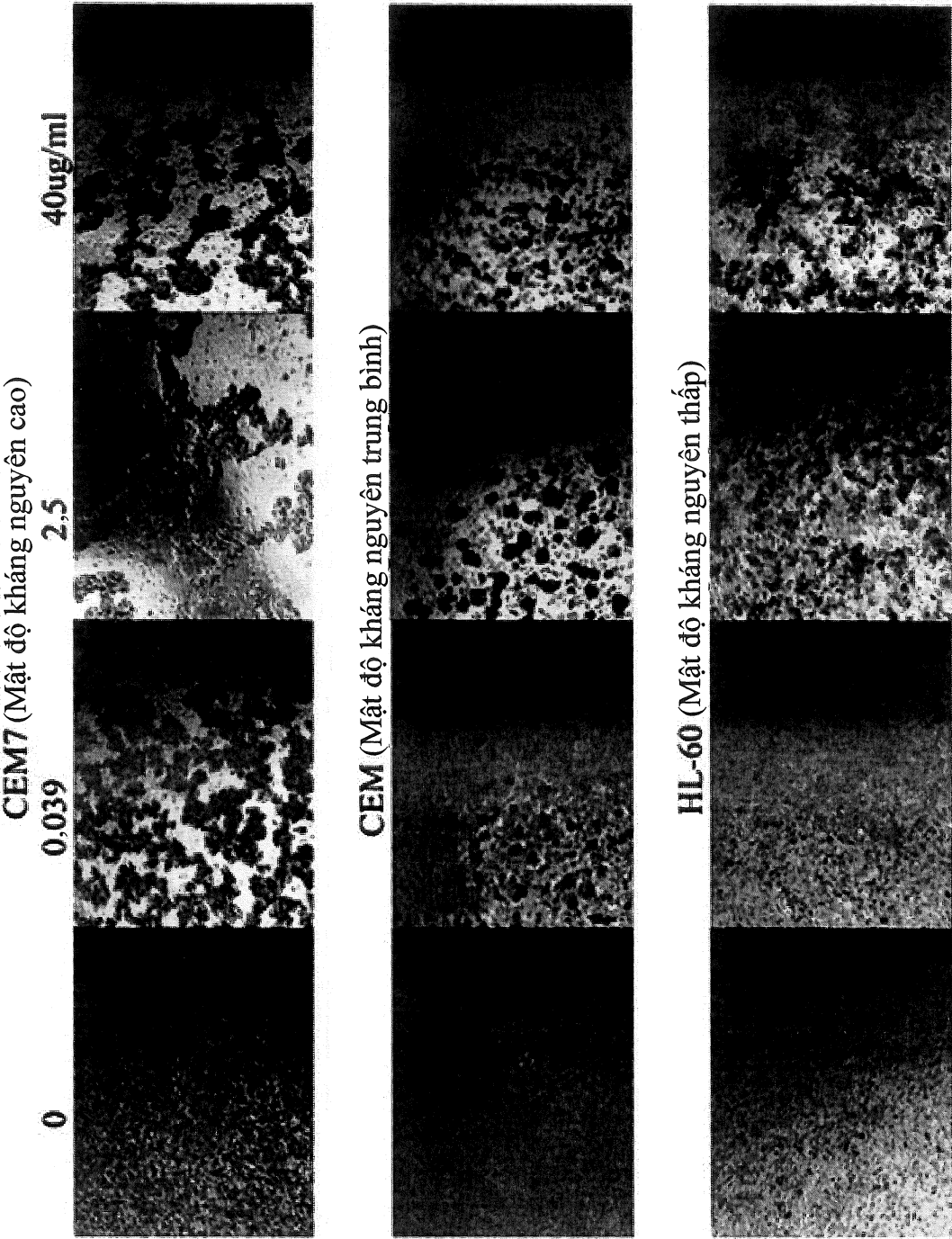


FIG. 21



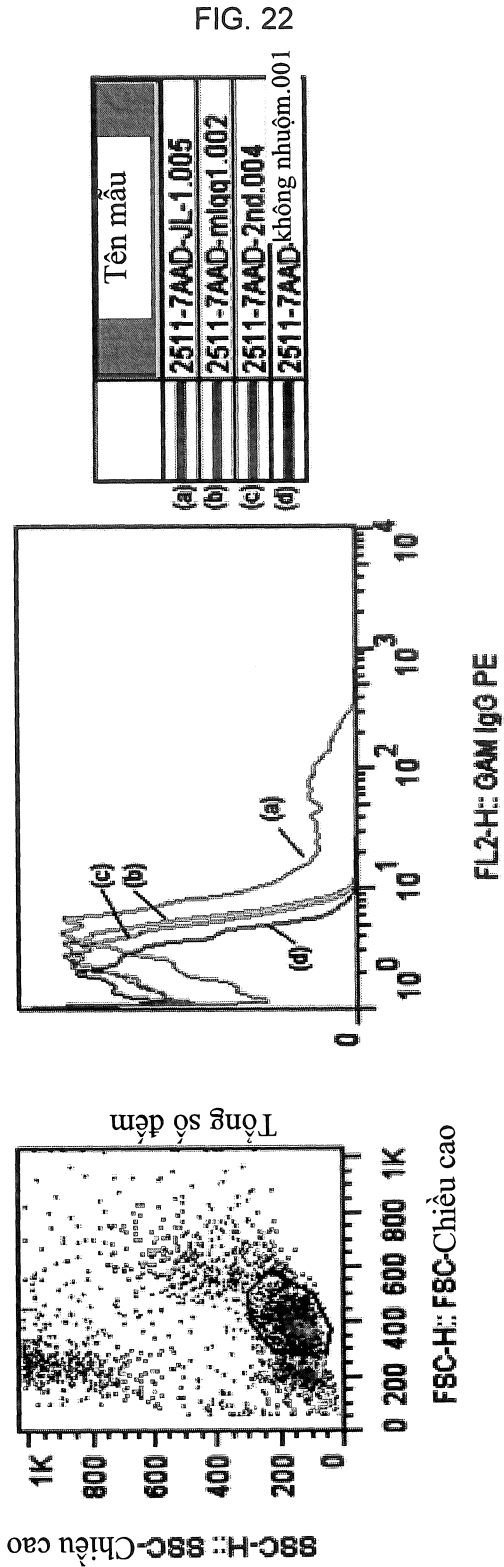


FIG. 23

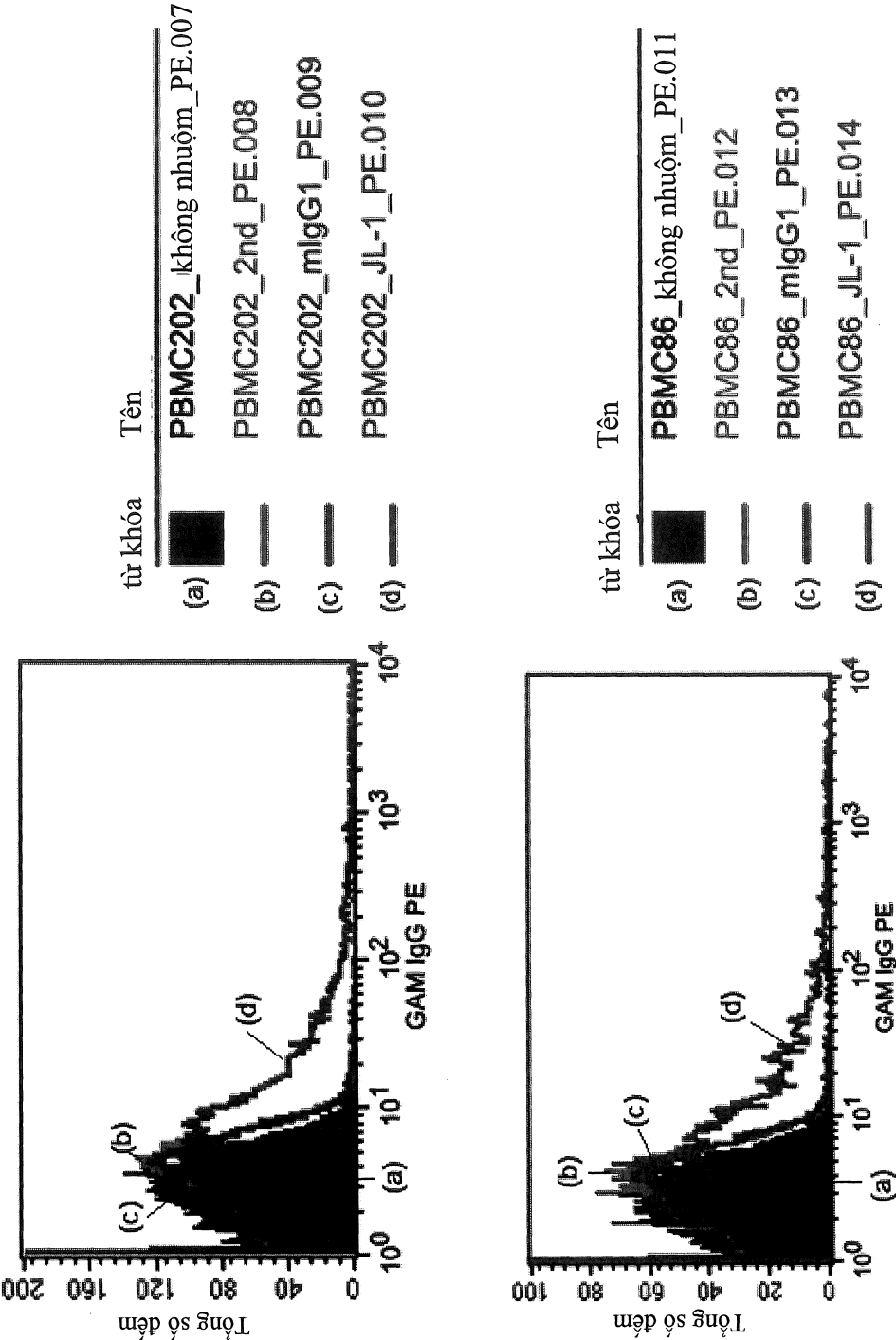


FIG. 24

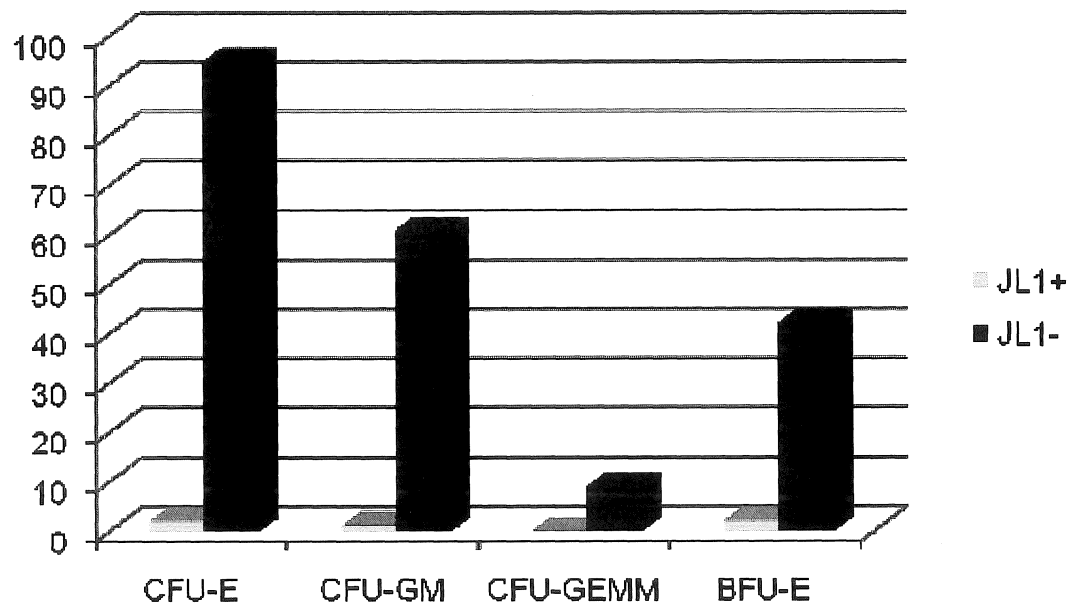


FIG. 25

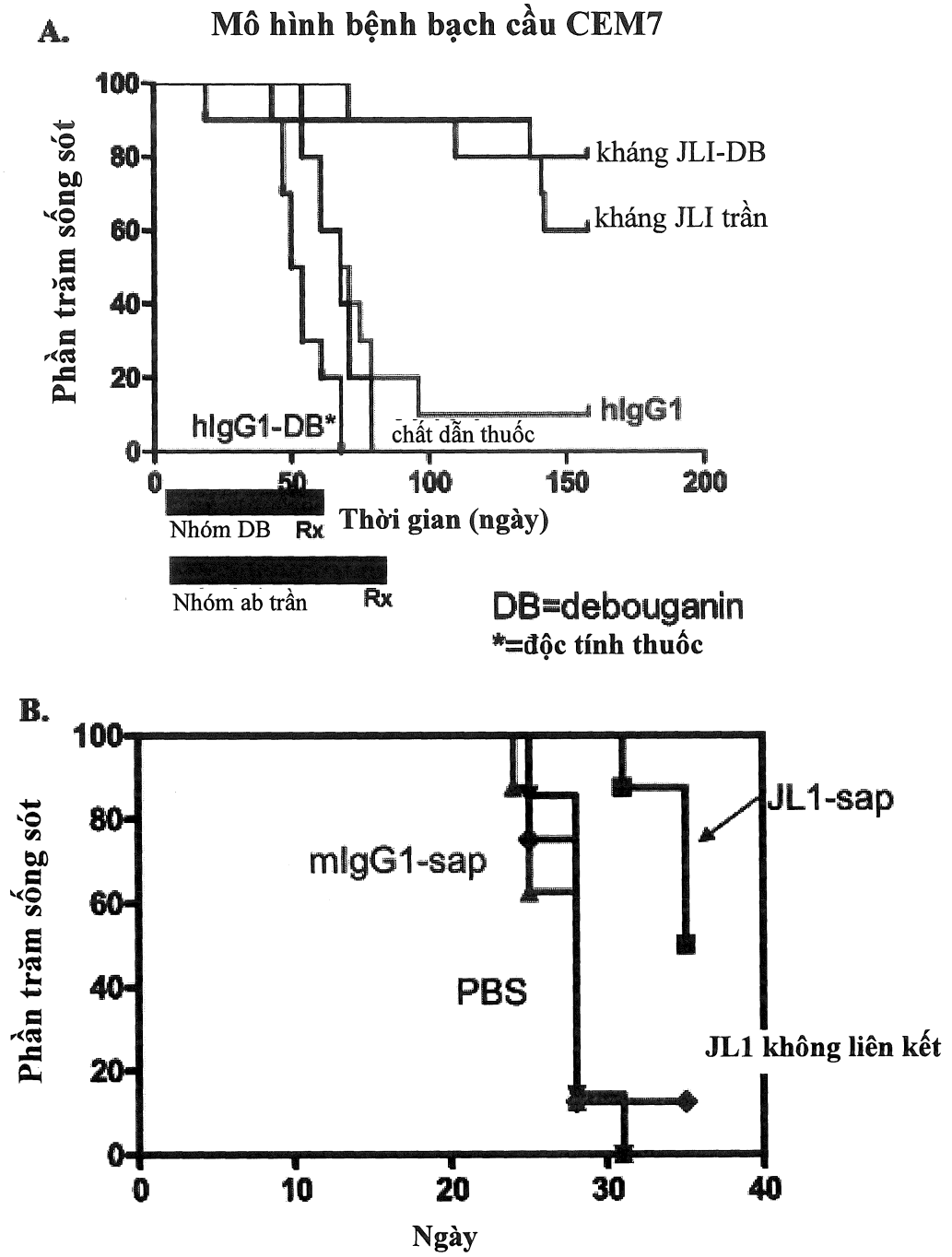


FIG. 26

Sự biểu hiện của JL1 trên AML tiên phát
bằng kiểu phụ FAB

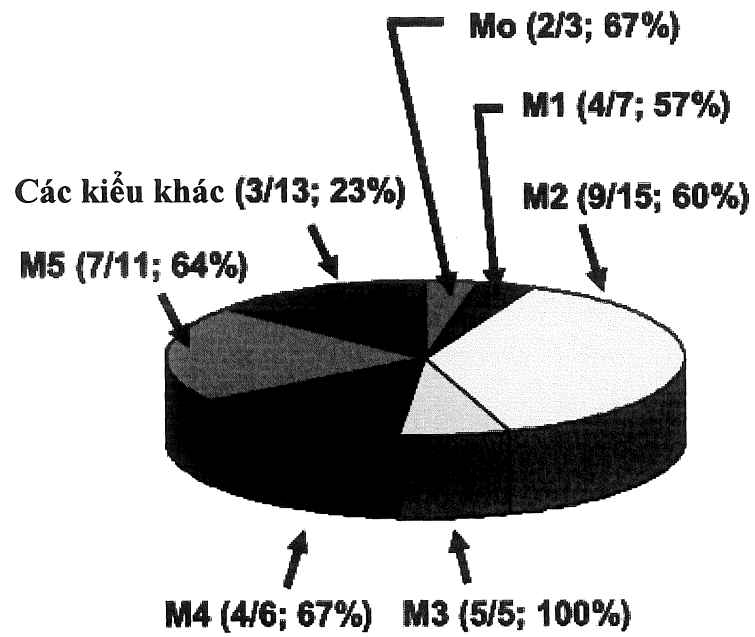
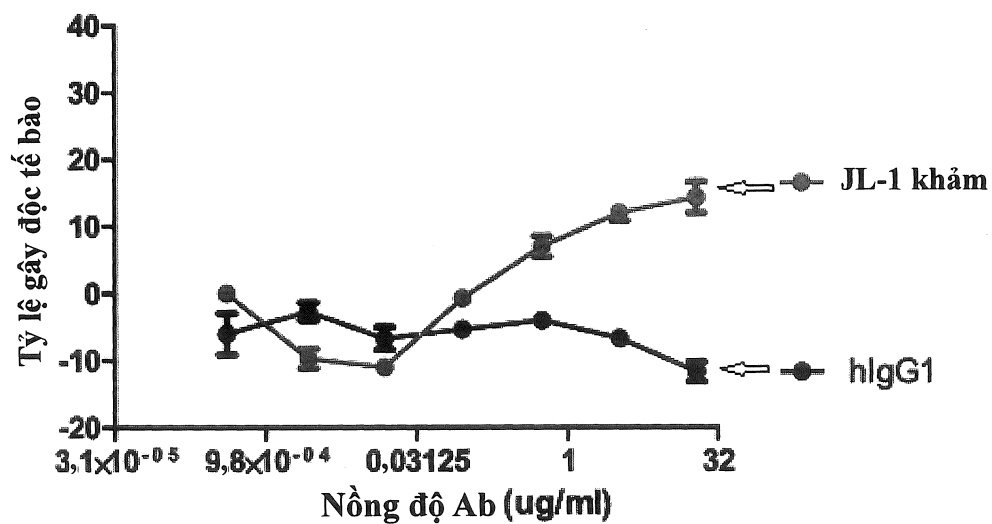


FIG. 27

A.

Thử nghiệm ADCC của JL-1 khảm trong các tế bào CEM7



B.

Thử nghiệm CDC của JL-1 khảm trong các tế bào CEM7

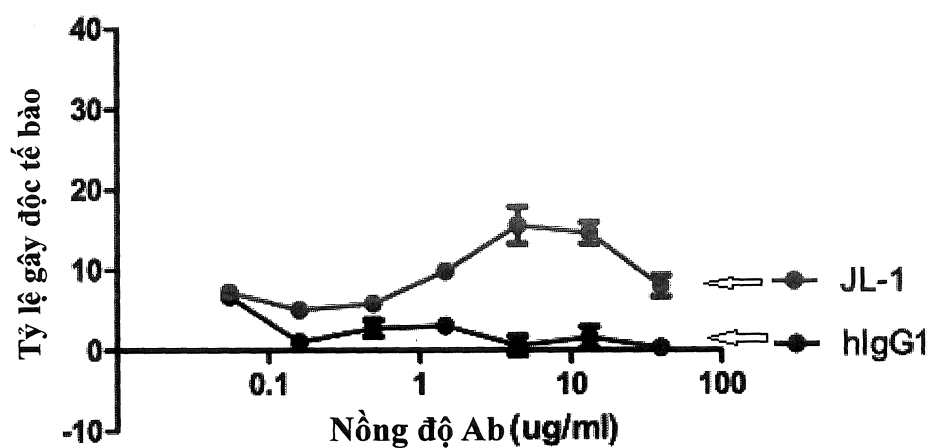
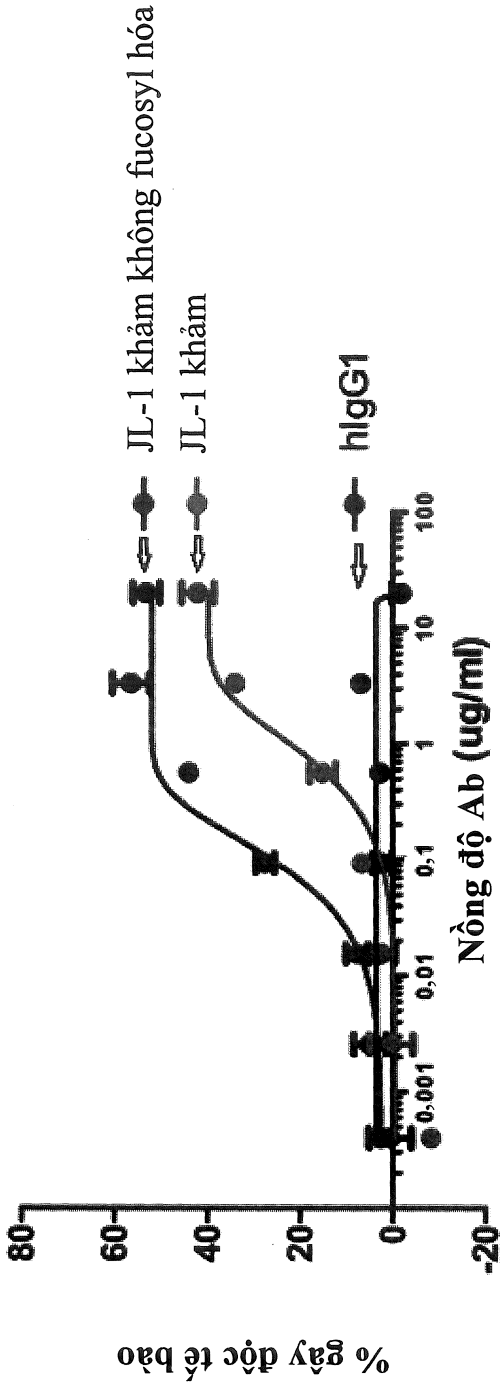


FIG. 28

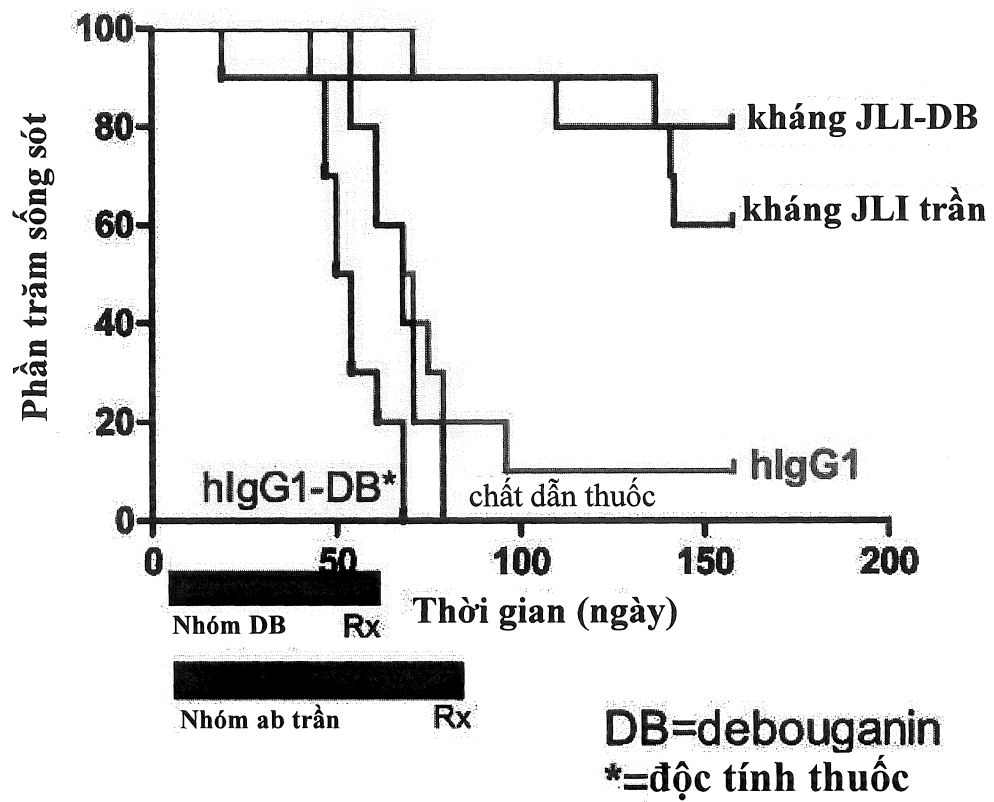
Thử nghiệm ADCC của JL-1 khảm được fucosyl hóa và không được fucosyl hóa trong các tế bào CEM7



	hlgG1	JL-1 khảm không fucosyl hóa	JL-1 khảm
EC50		0,1093	2,828

FIG. 29

Mô hình bệnh bạch cầu CEM7



Sự biểu hiện của JL1 trong các tế bào gốc bệnh bạch cầu

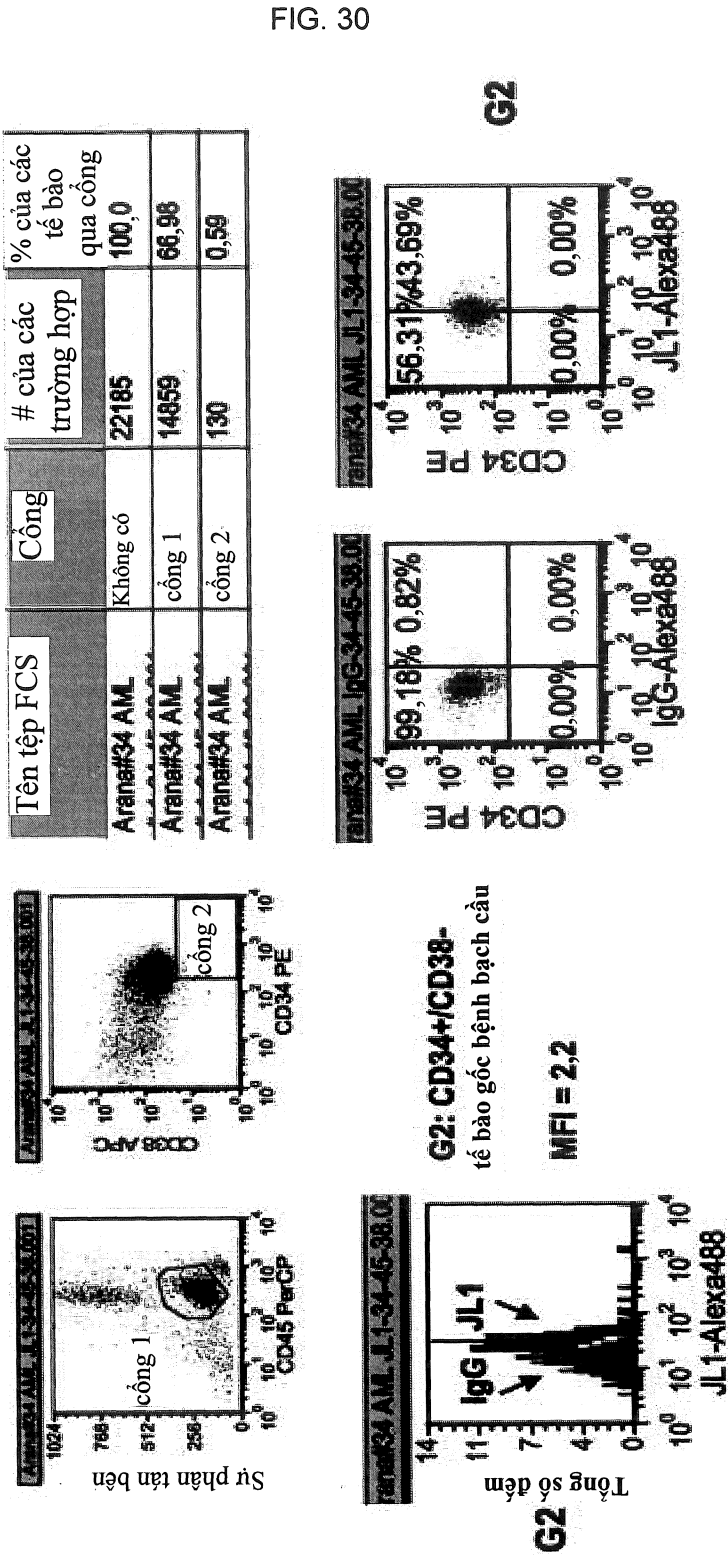
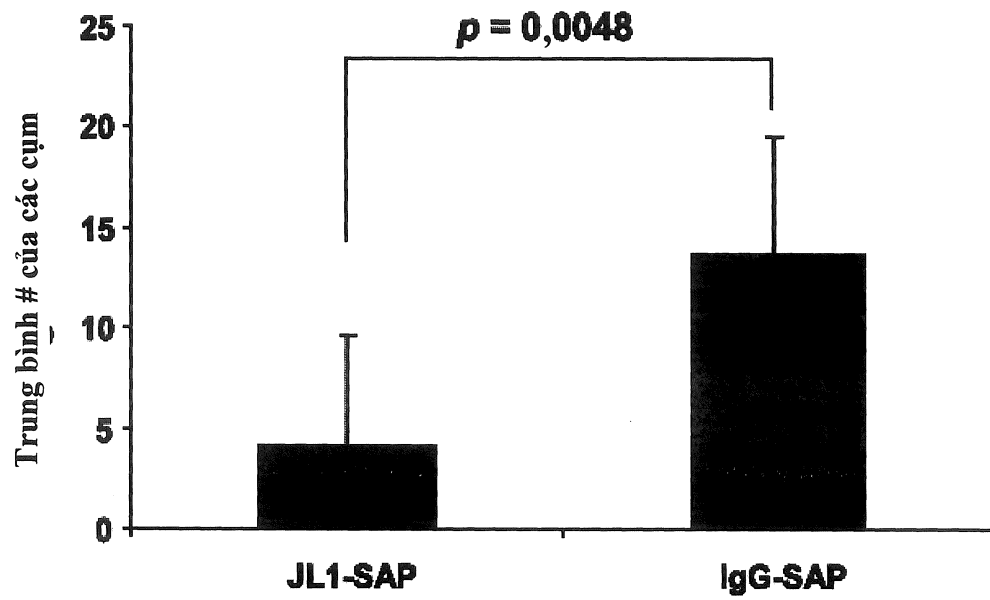


FIG. 30

FIG. 31

Tác dụng của JL1-SAP đối với các tế bào tạo cụm của các nguyên bào AML



Thử nghiệm tế bào tạo cụm

FIG. 32

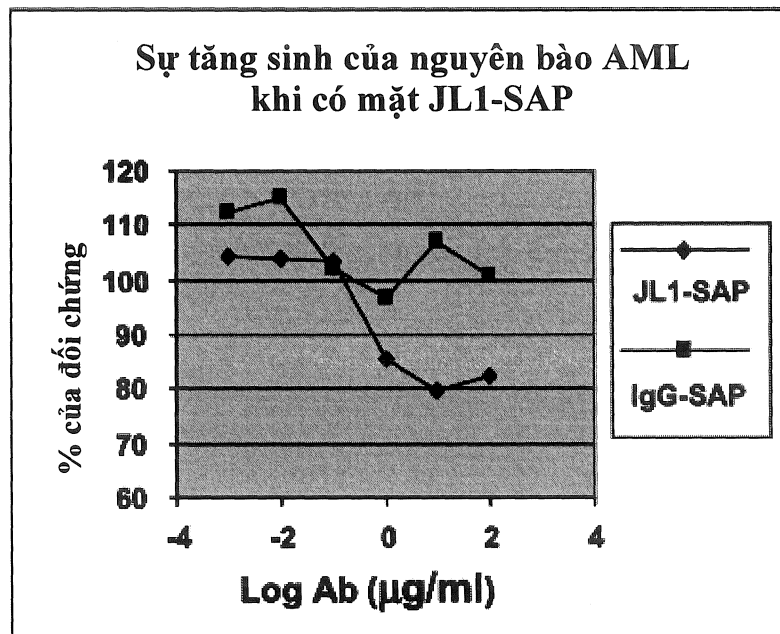
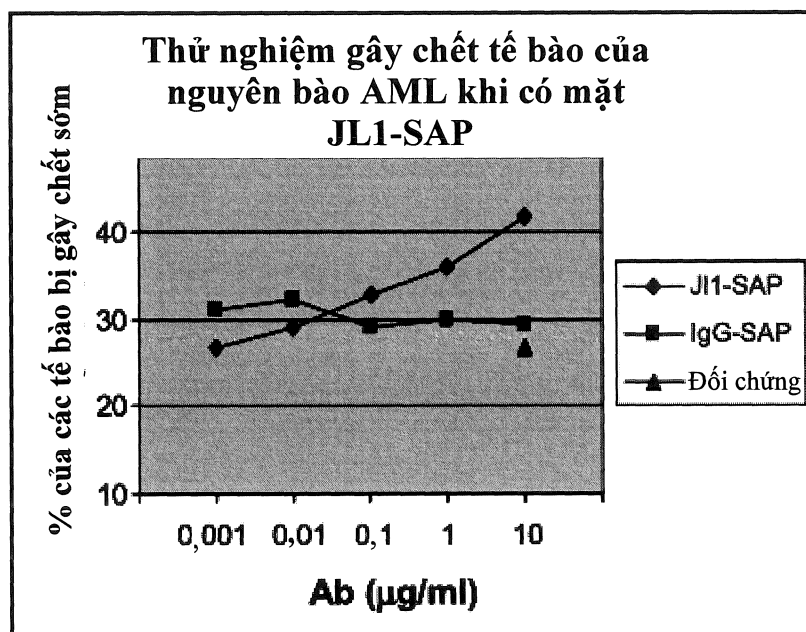
A.**B.**

FIG. 33

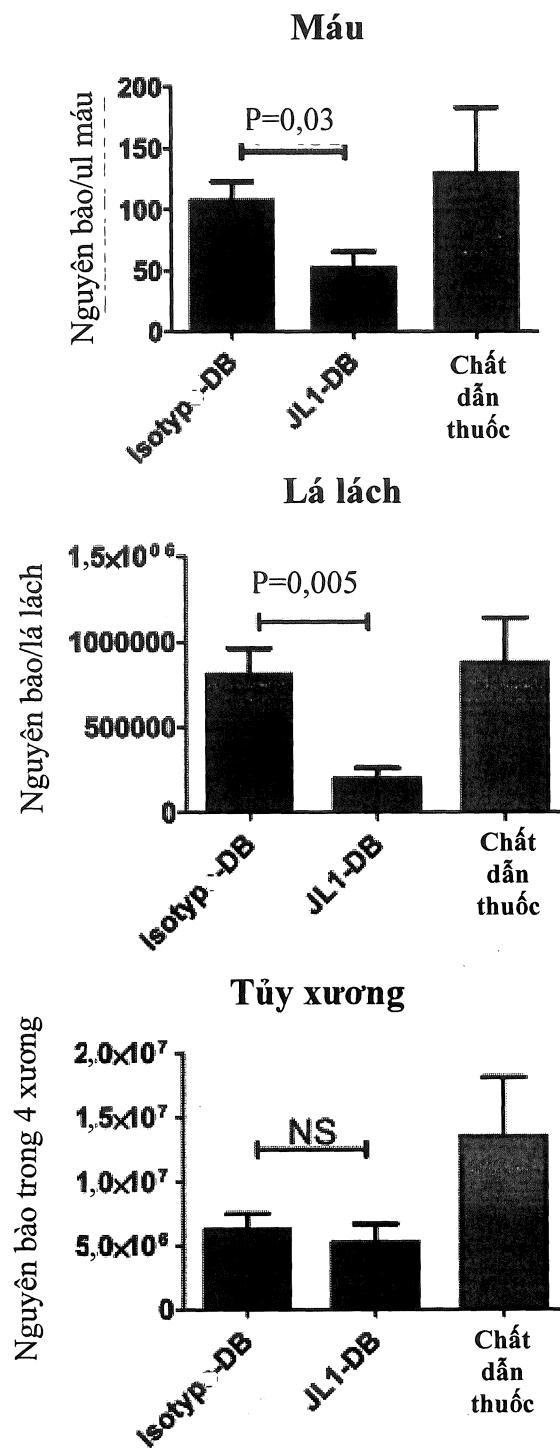
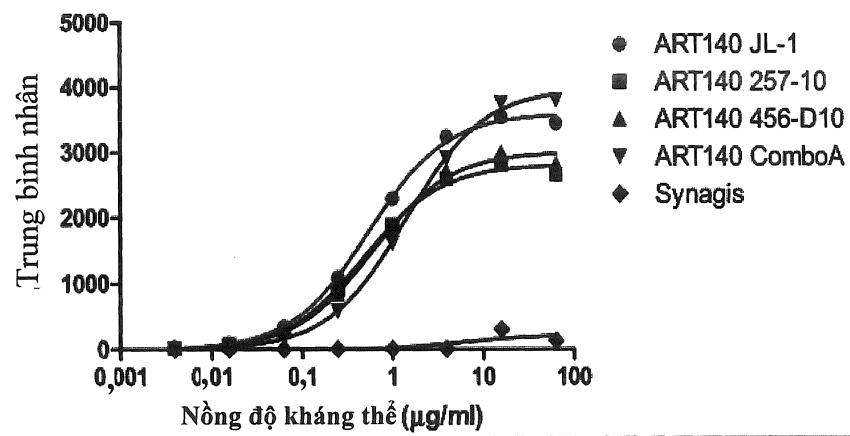


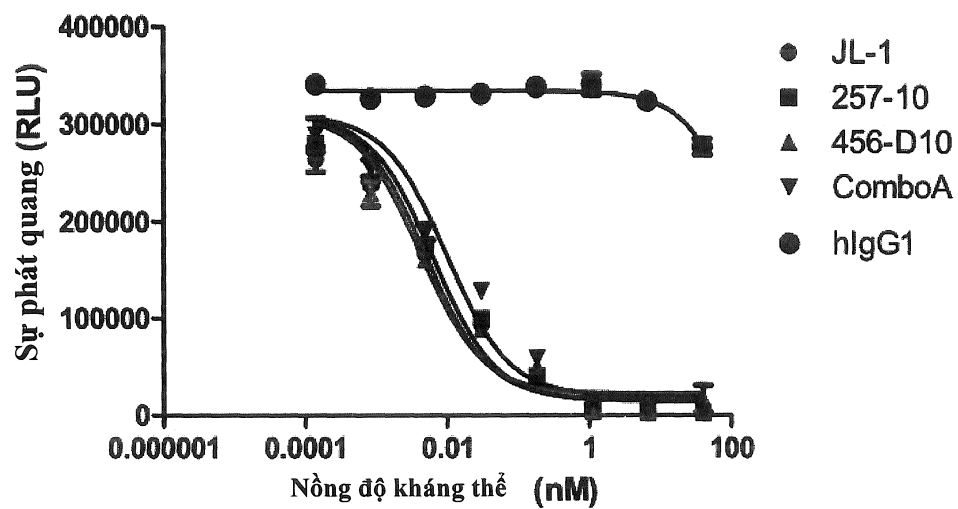
FIG. 34

Độ chuẩn dòng CME7 08312011

	ART140 JL-1	ART140 257-10	ART140 456-D10	ART140 ComboA	Synagis
EC50	0,5549	0,4841	0,6144	1,443	5,885

FIG. 35

Hoạt tính diệt của các biên thể được nhân hóa được liên kết độc tố



	JL-1	257-10	456-D10	ComboA	hlgG1
IC50	0,005186	0,006470	0,004285	0,01010	~ 3796

FIG. 36

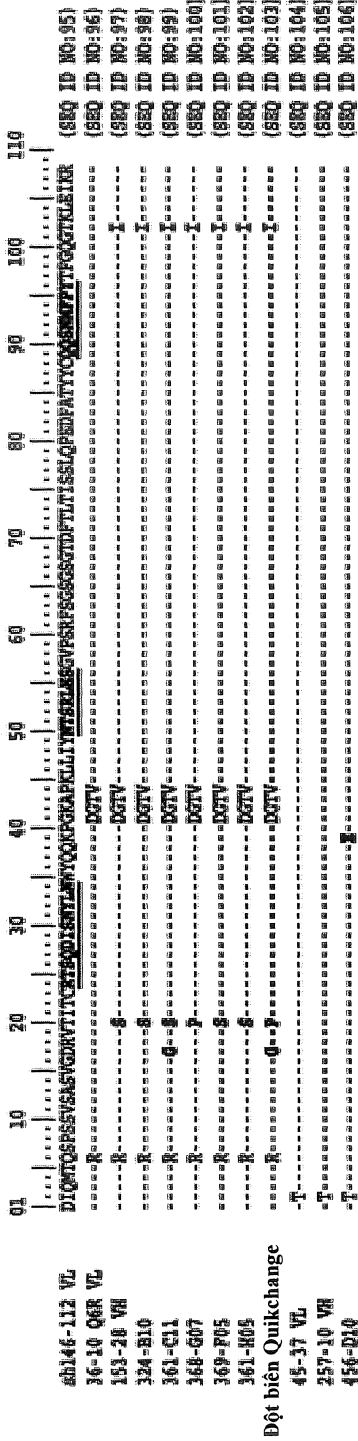
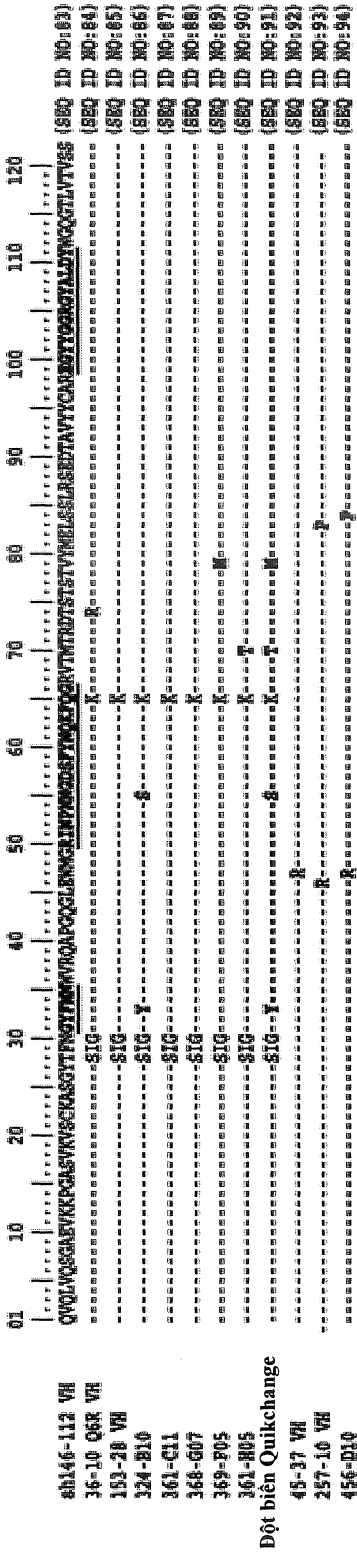
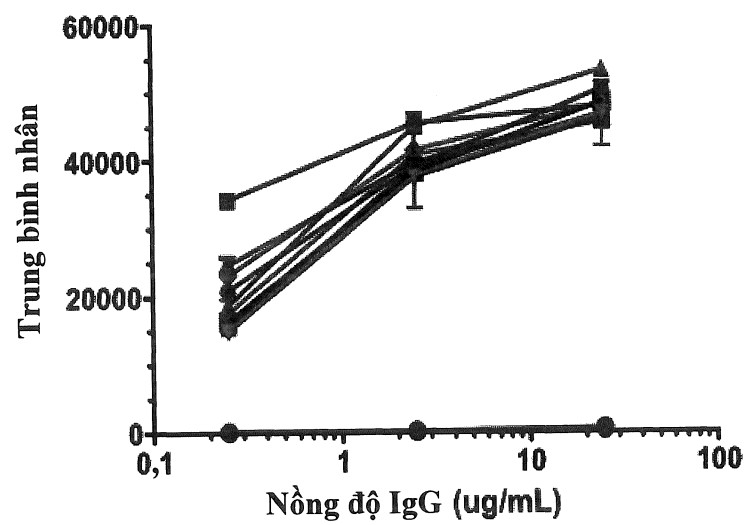


FIG. 37a

A.

Thử nghiệm liên kết tế bào: ART 140
Tế bào CEM 7, IgG được tinh chế,
Trung bình nhân, 01.06.11



- Đối chứng không có IgG
- JL-1
- ▲ 36-10 Q6R
- ▼ 153-28
- ◆ 257-10
- Synagis
- ▣ 324-B10
- △ 456-D10
- 361-C11
- 368-G07
- ▲ 369-F05
- ▼ 361-H05

FIG. 37b

B.

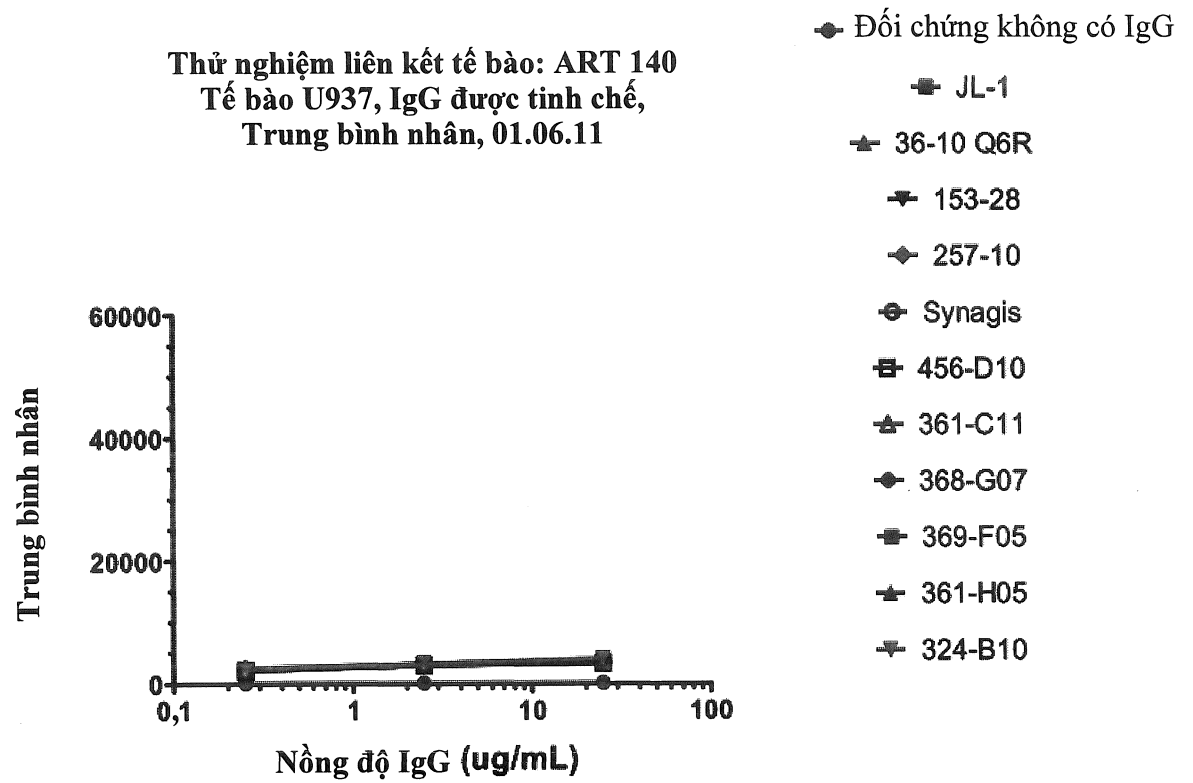
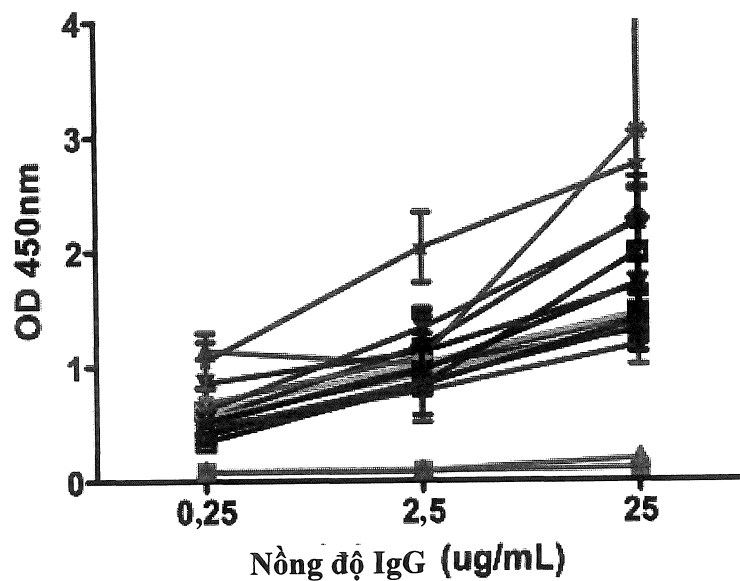


FIG. 38a

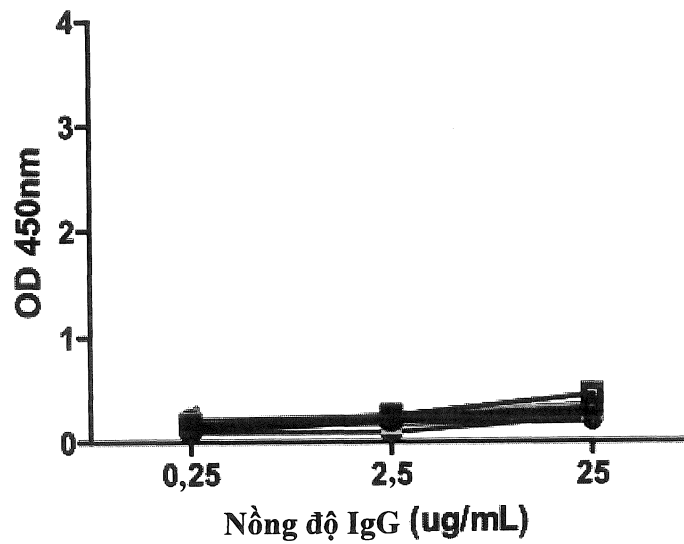
ELISA: ART 140
A. Tế bào CEM-7, IgG được tinh chế đĩa 1
01.06.11



- Đôi chứng không có IgG
- ▲ JL-1
- ▼ 36-10 Q6R
- ◆ 153-28
- ▣ 257-10
- △ Synagis
- 324-B10
- ▼ 352-17
- ◇ 409-G9
- ✱ 456-D10
- ✱ 361-C11
- ✱ 368-G7
- ✱ 369-F5
- ✱ 361-H5
- 353-74
- ▣ 349-04

FIG. 38b

ELISA: ART 140
B. Tế bào U937, IgG được tinh chế đĩa 2
01.06.11



- Đối chứng không có IgG
- JL-1
- 36-10 Q6R
- 153-28
- 257-10
- Synagis
- 324-74
- 352-B10
- 409-G9
- 456-D10
- 361-C11
- 368-G7
- 369-F5
- 361-H5
- 353-74
- 349-04

FIG. 39a

Thử nghiệm liên kết tế bào: ART 140
Tế bào CEM7, IgG đã tinh chế
Trung bình nhân, 04.08.11

A.

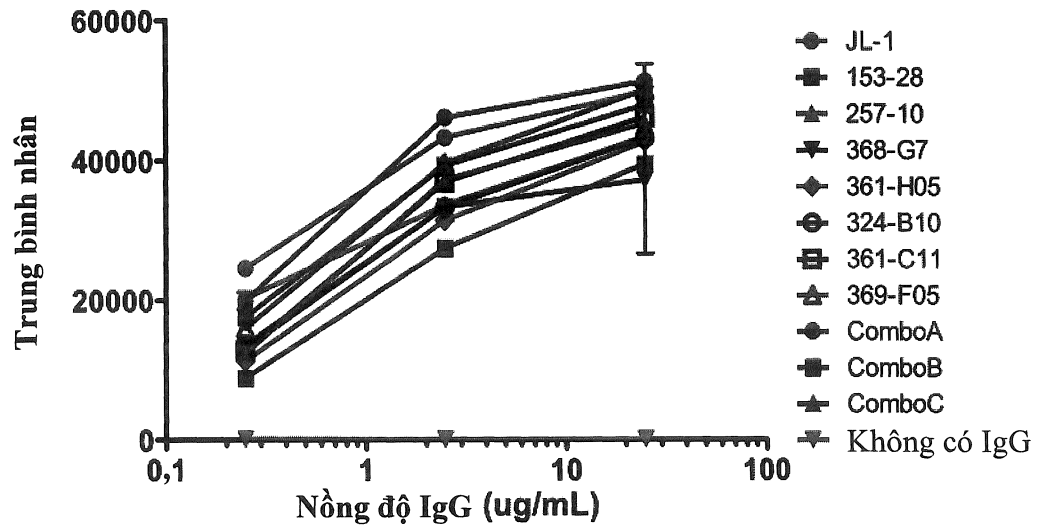


FIG. 39b

B.

Thử nghiệm liên kết tế bào: ART 140
Tế bào U937, IgG đã tinh chế
Trung bình nhân, 04.08.11

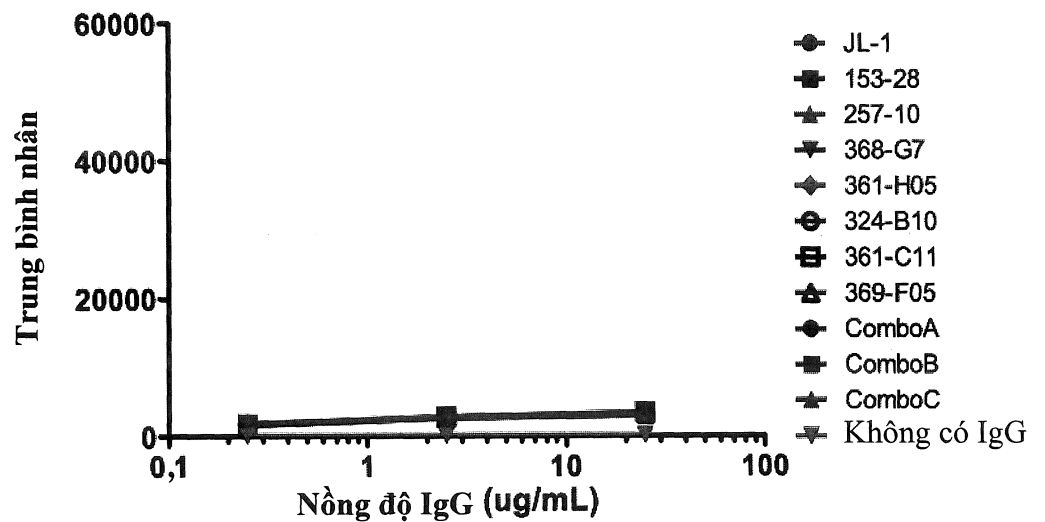


FIG. 40a

A. Thử nghiệm liên kết tế bào: ART 140
Tế bào CEM7, trung bình nhân IgG đã tinh chế, 04.08.11
Đột biến quikchange được liên kết so với khung gốc vòng 3

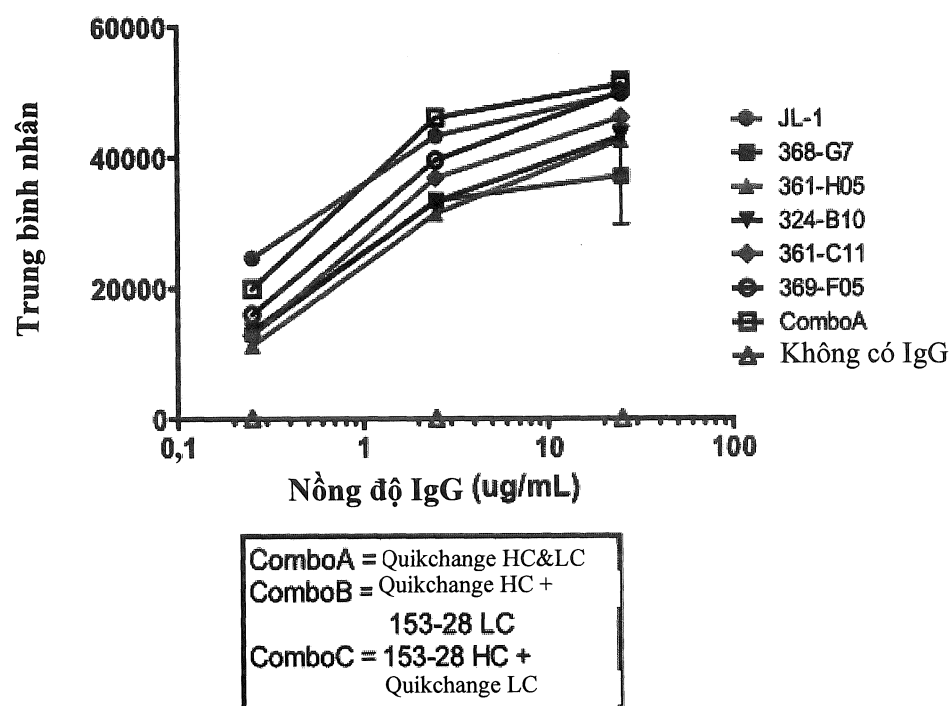


FIG. 40b

B. Thử nghiệm liên kết tế bào: ART 140
 Tế bào CEM7, trung bình nhân IgG đã tinh chế, 04.08.11
 Quikchange HC + 153-28 LC so với khung gốc vòng 3

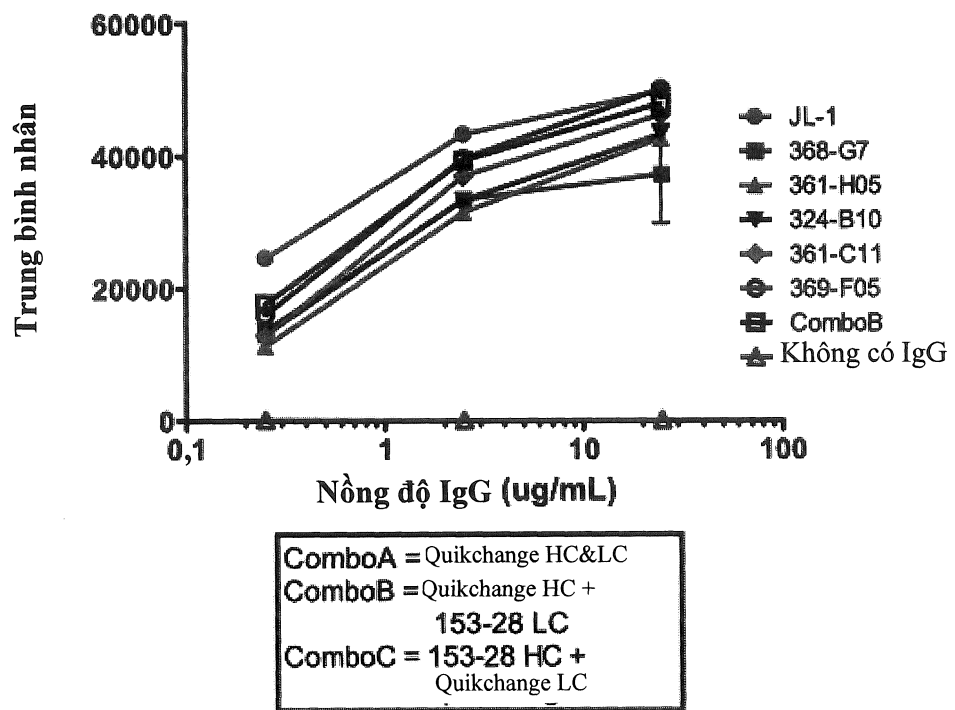
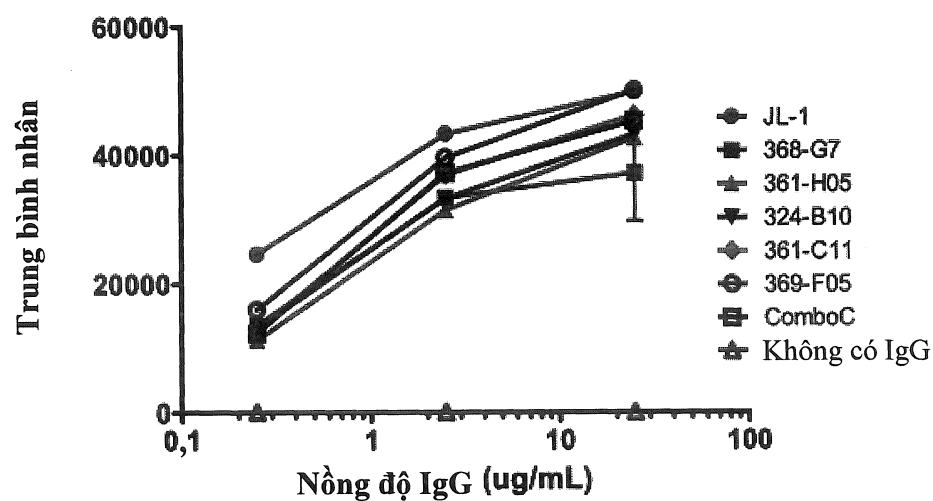


FIG. 40c

C. Thử nghiệm liên kết tế bào: ART 140
Tế bào CEM7, trung bình nhân IgG đã tinh chế, 04.08.11
153-28 HC + Quikchange LC so với khung gốc vòng 3



ComboA = Quikchange HC&LC
 ComboB = Quikchange HC +
 153-28 LC
 ComboC = 153-28 HC +
 Quikchange LC

FIG. 41c

C.

Các đột biến liên kết, ELISA dựa
trên tế bào đối với ART 140

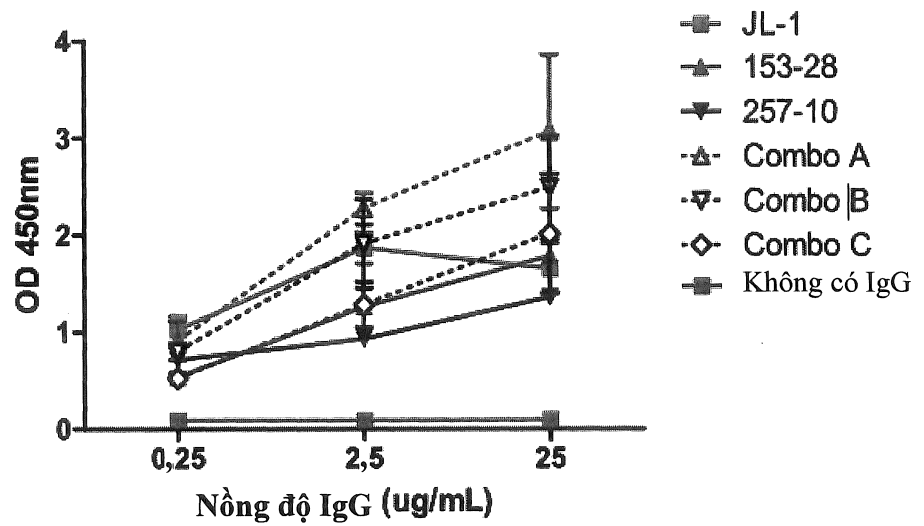


FIG. 42

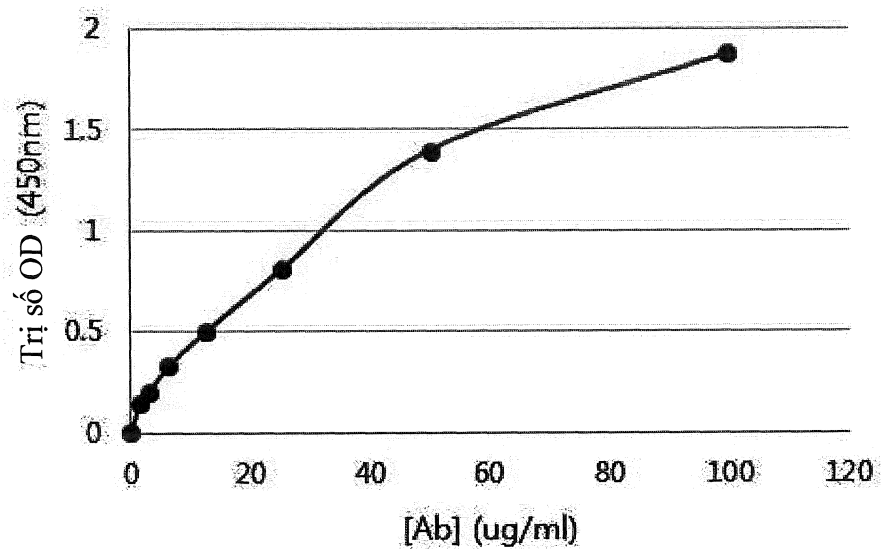


FIG. 43

huJL-1 257-10 Vk

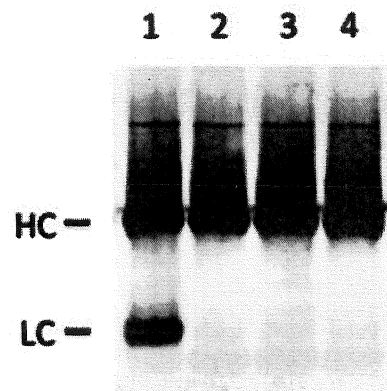
1-----10-----20-----30-----40-----50-----60
 DTQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRTSQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTSRLHSGVPS
 -----70-----80-----90-----100----107
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNMFPYTFGQGTKLEIK

huJL-1 257-10 VH

1-----10-----20-----30-----40-----50-----60
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNGYFMNWVRQAPGQGLERMGRINPNNGDSFY
 -----70-----80-----90-----100-----110-----120
 NQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELPSLRSED¹²²TAVYYCAREGYYGGRGYALDYWGQGTLLVTV

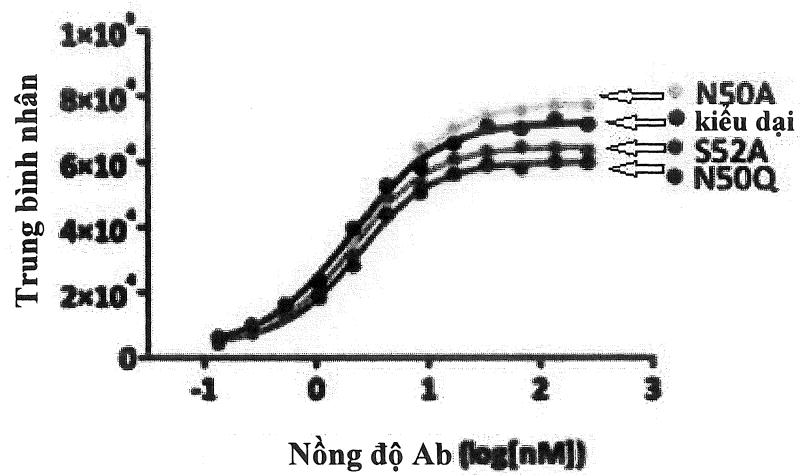
122
 SS

FIG. 44



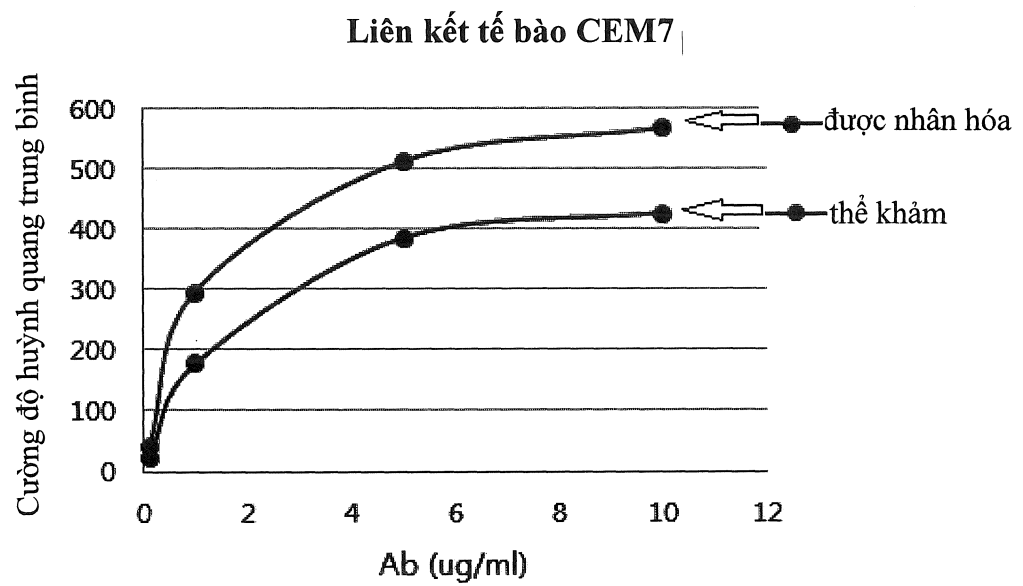
1: kiểu đại , 2: N50A, 3: N50Q, 4: S52A

FIG. 45



	WT	S52A	N50Q	N50A
EC50	2,052	2,134	2,393	2,843

FIG. 46



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> DINONA
- <120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD43 HOẶC MÀNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ, THỂ TIẾP HỢP VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA CHÚNG
- <130> OPP20162379KR
- <150> US 62/240,276
- <151> 2015-10-12
- <150> AU 2016901555
- <151> 2016-04-28
- <160> 134
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 366
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) Combo A đột biến quikchange
- <400> 1
caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg
60
tcctgcaagg ccagcgggcta cagcatcggc ggctactaca tgaactgggt gcgccaggct
120
cctggacagg gcctggaatg gatgggccgg atcaaccca acagcggcga cagcttctac
180
aaccagaaat tcaagggcag ggtgaccacg acccgcgaca ccagcaccag caccatgtac
240
atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
300
tattacggcg gcagaggcta cgcctggat tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360
tcctcc
366
- <210> 2
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của VH của Combo A đột biến quikchange

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met 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 Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của Combo A đột biến quikchange

<400> 3

gacatccaga tgaccggag ccctagcagc gtgtccgcca gcgtgggagg cagagtggcc
 60

atcacctgtc ggaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120

gacggcaccg tcaagctgct gatctacaac accagccggc tgcacagcgg cgtgccaaagc
 180

agattcagcg gcagcgggtc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
300

ggtatcaagc tggagatcaa gcgt
324

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của VL của Combo A đột biến quikchange

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Gly Arg Val Pro Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự nucleotit của VH của 257-10 (biến thể vòng 2)

<400> 5
caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtcaagggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcaac ggctacttca tgaactgggt gaggcaggcc
120

cctgggcagg gactggagcg gatgggccgc atcaacccca acaacggcga cagcttctac
180

aaccagaagt tccagggccg cgtcaccatg accgcgcaca ccagcaccag caccgtgtac
240

atggagctgc ccagcctgcg cagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360

tcctcc
366

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của VH của 257-10 (Biến thể vòng 2)

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr
20 25 30
Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Pro Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VL của 257-10 (biến thể vòng 2)

<400> 7
 gacacccaga tgacccagag cccttcttct gtctccgcca gcgtagggcga ccgcgtgacc
 60
 atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accagcaggc tccactctgg agtccccagc
 180
 cgcttctccg gctccgggtc tggaaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc
 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcgggcag
 300
 gggaccaagc tggagatcaa gcgta
 325

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của VL của 257-10 (biến thể vòng 2)

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VH của 456-D10

<400> 9
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtcaagggtg
 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcaac ggctacttca tgaactgggt gaggcaggcc
 120

cctgggcagg gactggagcg gatggggcgc atcaacccca acaacggcga cagcttctac
 180

aaccagaagt tccagggccg cgtcaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac
 240

atggagctgc ccagcctgcg cagcgaggac accgccgtgt actactgcg cagggagggc
 300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcacccct ggtgaccgtg
 360

tcctcc
 366

<210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Axit amin VH của 456-D10

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

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

```

<210>      11
<211>      324
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      Trình tự nucleotit của VL của 456-D10

<400>      11
gacacccaga tgaccagag cccttcttct gtctccgccg gcgtggggcg ccgcgtgacc
60
atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcaggagccc
120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accagcaggc tccactctgg agtccccagc
180
cgctttctccg gctccgggtc tggaaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc
240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcgggcag
300
gggaccaagc tggagatcaa gcgg
324

```

<210>	12
<211>	108
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của VL của 456-D10

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 13

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của VH của 324-B10

<400> 13

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg
 60

tcctgcaagg ccagcgggcta cagcatcggc ggctactaca tgaactgggt gcgccaggct
 120

cctggacagg gcctggaatg gatgggcccgg atcaacccca acagcggcga cagcttctac
 180

aaccagaaat tcaagggcag ggtgaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac
 240

atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
 300

tattacggcg gcagaggcta cgccctggat tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
 360

tcctcc
366

<210> 14
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của VH của 324-B10

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg 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 Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của VL của 324-B10

<400> 15
gacattcaga tgacccggag ccctagcagc gtgtccgccca gcgtgggcga cagagtgtcc
60

atcacctgtc ggaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
120

gacggcaccg tcaagctgct gatctacaac accagccggc tgcacagcgg cgtgccaaagc
180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
300

ggtatcaagc tggagatcaa gcgg
324

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của VL của 324-B10

<400> 16
Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 17
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của VH của 361-C11

<400> 17

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcatcggc ggctacttca tgaactgggt gcgccaggct
120

cctggacagg gcctggaatg gatgggcccgg atcaacccca acaacggcga cagcttctac
180

aaccagaaat tcaagggcag ggtgaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac
240

atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
300

tattacggcg gcagaggcta cgccctggat tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360

tcctcc
366

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của VH của 361-C11

<400> 18

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Gly	Gly	Tyr
			20					25					30		

Phe	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

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

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	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	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VL của 361-C11

<400> 19
 gacattcaga tgacccggag ccctagcagc gtgtccgcca gcgtgggcgg cagagtgtcc
 60

atcacctgtc ggaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120

gacggcaccg tcaagctgct gatctacaac accagccggc tgcacagcgg cgtgccaagc
 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
 300

ggtatcaagc tggagatcaa gcgg
 324

<210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của VL của 361-C11

<400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

<210> 21
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VH của 368-G07

<400> 21
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg
 60
 tcntgcaagg ccagcggcta cagcatcggc ggctacttca tgaactgggt gcgccaggct
 120
 cctggacagg gcctggaatg gatgggcccgg atcaacccca acaacggcga cagcttctac
 180
 aaccagaaat tcaagggcag ggtgaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac
 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
 300
 tattacggcg gcagaggcta cgccttggat tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
 360
 tcctcc
 366

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của VH của 368-G07

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg 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 Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nucleotit của VL của 368-G07

<400> 23
 gacattcaga tgacccggag ccctagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgcc
 60
 atcacctgtc ggaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120
 gacggcaccg tcaagctgct gatctacaac accagccggc tgcacagcgg cgtgccaaagc
 180
 agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
 300
 ggtatcaagc tggagatcaa gcgg
 324

<210> 24
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của VL của 368-G07

<400> 24
 Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Pro Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 25
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VH của 369-F05

<400> 25
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg
 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta cagcatcggc ggctacttca tgaactgggt gcgccaggct
 120
 cctggacagg gcctggaatg gatgggcccgg atcaacccca acaacggcga cagcttctac
 180

aaccagaaat tcaagggcag ggtgaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccatgtac
240

atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
300

tattacggcg gcagaggcta cgccctggat tactggggcc agggcacctt ggtgaccgtg
360

tcctcc
366

<210> 26
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của VH của 369-F05

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

<210> 27
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của VL của 369-F05

<400> 27

gacattcaga tgacccggag ccctagcagc gtgtccgcca gcgtagggcga cagagtgtcc
60

atcacctgtc ggaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
120

gacggcaccg tcaagctgct gatctacaac accagccggc tgcacagcgg cgtgccaaagc
180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
300

ggtatcaagc tggagatcaa gcgg
324

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của VL của 369-F05

<400> 28

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

Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		

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

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

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

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Met	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	

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

<210> 29
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VH của 361-H05

<400> 29
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg
 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta cagcatcggc ggctacttca tgaactgggt gcgccaggct
 120
 cctggacagg gcctggaatg gatggggccgg atcaacccca acaacggcga cagcttctac
 180
 aaccagaaat tcaagggcag ggtgaccacg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac
 240
 atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
 300
 tattacggcg gcagaggcta cgccctggat tactggggcc agggcaccct ggtgactgtg
 360
 tcctcc
 366

<210> 30
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của VH của 361-H05

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

Lys Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg 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 Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của VL của 361-H05

<400> 31
 gacattcaga tgacccggag ccctagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtatcc
 60
 atcacctgtc ggaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120
 gacggcaccg tcaagctgct gatctacaac accagccggc tgcacagcgg cgtgccaaagc
 180
 agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
 300
 ggtatcaagc tggagatcaa gcgg
 324

<210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của VL của 361-H05

<400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 33
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của chuỗi nặng (HC) (mJL-1) IgG kháng CD43 ở chuột

<400> 33
 gaggttcagc tgcagcagtc tggctcctgag ctggtgaagc ctggggccttc agtgaagatt
 60
 tcctgcaagg cctctgggta ctcaattggg ggctacttta tgaactgggt gaagcagagc
 120
 cacggcaaga gccctgagtg gattgggcgt attaatccta acaatgggtga ttctttctac
 180
 aaccagaaat tcaagggcac ggccacattg actgttgacc gctcttctga cacagtccac
 240
 atggaggtcc tgagcctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgg ccgcgaaggt
 300
 tactacgggtg ggcgaggcta tgctttggac tactggggtc aaggcacctc ggtcaccgtc
 360
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccgcg tgctctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgctgtgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 34

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của HC (mJL-1) IgG kháng CD43 ở chuột

```

<400>      34
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1              5              10              15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
      20              25              30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Pro Glu Trp Ile
      35              40              45

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

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

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

Gly Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
      100              105              110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115              120              125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130              135              140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145              150              155              160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
      165              170              175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
      180              185              190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195              200              205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210              215              220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225              230              235              240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
      245              250              255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
      260              265              270

```

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

<210> 35
 <211> 5734
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vectơ đầy đủ của HC của(mJL-1) IgG kháng CD43 ở chuột được sử dụng để biểu hiện (dựa trên pTT5)

<400> 35
 gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt tgacattgat tattgactag
 60

ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt
 120

tacataactt acggtaaatg gcccgctgg ctgaccgcc aacgacccc gccattgac
180

gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg
240

ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag
300

tccgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat
360

gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat
420

ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt
480

tccaagtctc caccacattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga
540

ctttccaaaa tgtcgtaata accccgcccc gttgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg
600

gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcctca ctctcttcg
660

catcgctgtc tgcgagggcc agctgttggg ctgcggttg aggacaaact cttcgcggtc
720

tttccagtac tcttggatcg gaaacccgtc ggcctccgaa cgggtactccg ccaccgaggg
780

acctgagcga gtccgcatcg accggatcgg aaaacctctc gagaaaggcg tctaaccagt
840

cacagtcgca aggtaggctg agcaccgtgg cgggcggcag cgggtggcgg tcggggttgt
900

ttctggcgga ggtgctgctg atgatgtaat taaagtaggc ggtcttgaga cggcggatgg
960

tcgaggtgag gtgtggcagg cttgagatcc agctgttggg gtgagtactc cctctcaaaa
1020

gcgggcatta cttctgcgct aagattgtca gtttccaaaa acgaggagga ttgatattc
1080

acctggcccc atctggccat aacttgagt gacaatgaca tccactttgc ctttctctcc
1140

acaggtgtcc actcccaggt ccaagtttgc cgccaccatg gcttggatga tgcttctcct
1200

cggactcctt gcgtacggat caggagaggt tcagctgcag cagtctggtc ctgagctggt
1260

gaagcctggg gcttcagtga agatttcctg caaggcctct ggttactcaa ttggtggcta
1320

ctttatgaac tgggtgaagc agagccacgg caagagccct gagtggattg ggcgtattaa
1380

tcctaacaat ggtgattctt tctacaacca gaaattcaag ggcacggcca cattgactgt
1440

tgaccgctct tctgacacag tccacatgga ggtcctgagc ctgacatctg aggactctgc
1500

agtctattat tgtggccgcg aaggttacta cggtagggcga ggctatgctt tggactactg
1560

gggtcaaggc acctcgggtca ccgtctcttc agctagcacc aaggggcccat cggctctccc
1620

cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa
1680

ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt
1740

gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac
1800

cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag
1860

caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc
1920

accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc
1980

caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag
2040

ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc
2100

caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac
2160

cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc
2220

cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca
2280

ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg
2340

cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
2400

ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta
2460

cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt
2520

gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa
2580

ataggatccc ccgacctga cctctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt
2640

gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggg
2700

cgagatccct cggagatctc tagctagagg atcgatcccc gcccgggacg aactaaacct
2760

gactacgaca tctctgcccc ttcttcgcgg ggcagtgcac gtaatccctt cagttggttg
2820

gtacaacttg ccaactgaac cctaaacggg tagcatatgc ttcccgggta gtagtatata
2880

ctatccagac taaccctaata tcaatagcat atgttaccca acgggaagca tatgctatcg
2940

aattagggtt agtaaaaggg tcctaaggaa cagcgatgta ggtgggcggg ccaagatagg
3000

ggcgcgattg ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag cgccaagcac
3060

agggttgttg gtcctcatat tcacgaggtc gctgagagca cgggtgggcta atgttgccat
3120

gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaatact atatctgggt
3180

agcataggct atcctaatact atatctgggt agcatatgct atcctaatact atatctgggt
3240

agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaatact atatctgggt
3300

agcatatgct atcctaatact atatctgggt agtatatgct atcctaatact gtatccgggt
3360

agcatatgct atcctaatag agattagggg agtatatgct atcctaattt atatctgggt
3420

agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca
3480

tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca
3540

tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat ctgggtagca
3600

taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta
3660

tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca tatgctatcc tcatgataag ctgtcaaaca
3720

tgagaattaa ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg
3780

tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcgggggaaat gtgcgcggaa
3840

cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac
3900

cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg
3960

tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc
4020

tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg
4080

atctcaacag cggtaaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga
4140

gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tggtgacgcc gggcaagagc
4200

aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag
4260

aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga
4320

gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg
4380

cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga
4440

atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg gcaacaacgt
4500

tcgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact
4560

ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttcg gctggctggt
4620

ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg
4680

ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta
4740

tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac
4800

tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta
4860

aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt
4920

tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt
4980

tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt
5040

gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc
5100

agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg
5160

tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg
5220

ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg
5280

cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac
5340

tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg
5400

acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg
5460

gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat
5520

ttttgtgatg ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt
5580

taagggttcct ggcctttttgc tggccttttg ctacacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg
5640

attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa
5700

cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagc
5734

<210> 36

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của chuỗi nhẹ (LC) (mJL-1) IgG kháng CD43 ở chuột

<400> 36

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggcga ccgcgtcacc
60

atcagctgcc ggacaagtca ggacattagc aattatttga actggtatca gcagaaacca
120

gatggtactg ttaaactcct gatctataac acatcacgct tgcactcagg cgccccatca
180

cggtttcagtg gcagcggggtc tggtagagat tattccctca ccattcgcaa cctggaacaa
240

aaagatatg ccaacttactt ttgccaacag agcaatatgt ttccgtacac gttcggggggg
300

gggaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagttcac cggtgacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
642

<210> 37
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin của LC của (mJL-1) IgG kháng CD43 ở chuột

<400> 37
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Arg Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Lys Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 38
 <211> 5038
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vectơ đầy đủ của LC của (mJL-1) IgG kháng CD43 ở chuột được sử dụng để biểu hiện
 (dựa trên pTT5)

<400> 38
 gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt tgacattgat tattgactag
 60

ttattaatag taatcaatta cggggctcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt
 120

tacataactt acggtaaatg gcccgcttgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac
 180

gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg
 240

ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaa
 300

tccgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat
 360

gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat
 420

ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt
 480

tccaagtctc caccaccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga
 540

ctttccaaaa tgtcgtaata accccgcccc gttgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg
 600

gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcctca ctctcttccg
 660

catcgctgtc tgcgagggcc agctgttggg ctgcggttg aggacaaact cttcgcggtc
 720

tttccagtac tcttggatcg gaaacccgtc ggcctccgaa cgggtactccg ccaccgaggg
 780

acctgagcga gtccgcatcg accggatcgg aaaacctctc gagaaaggcg tctaaccagt
840

cacagtcgca aggtaggctg agcaccgtgg cgggcggcag cgggtggcgg tcggggttgt
900

ttctggcgga ggtgctgctg atgatgtaat taaagtaggc ggtcttgaga cggcggatgg
960

tcgaggtgag gtgtggcagg cttgagatcc agctgttggg gtgagtactc cctctcaaaa
1020

gcgggcatta cttctgcgct aagattgtca gtttccaaaa acgaggagga tttgatattc
1080

acctggcccg atctggccat acacttgagt gacaatgaca tccactttgc ctttctctcc
1140

acaggtgtcc actcccaggt ccaagtttgc cgccaccatg gatatgaggg taccagcaca
1200

acttctcgga ttactattgt tatggctgcg aggtgcgcg tgtgatatcc agatgacaca
1260

gactacatcc tccctgtctg cctctctggg cgaccgcgtc accatcagct gccggacaag
1320

tcaggacatt agcaattatt tgaactggta tcagcagaaa ccagatggta ctgttaaact
1380

cctgatctat aacacatcac gcttgcactc aggcgtccca tcacggttca gtggcagcgg
1440

gtctggtaca gattattccc tcaccattcg caacctggaa caaaaagata ttgccactta
1500

cttttgccaa cagagcaata tgtttccgta cacgttcggg ggggggacca agctggaaat
1560

caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc ccatctgatg agcagttgaa
1620

atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
1680

acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca
1740

ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta
1800

cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagtt caccggtgac
1860

aaagagcttc aacaggggag agtggttagga tcccccgacc tcgacctctg gctaataaag
1920

gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg gaattttttg tgtctctcac tcggaaggac
1980

atatgggagg gcaaatacatt tggtcgagat ccctcggaga tctctagcta gaggatcgat
2040

ccccgccccg gacgaactaa acctgactac gacatctctg ccccttcttc gcggggcagt
2100

gcatgtaatc ccttcagttg gttggtacaa cttgccaaact gaaccctaaa cgggtagcat
2160

atgcttcccc ggtagtagta tatactatcc agactaacc taattcaata gcatatgtta
2220

cccaacggga agcatatgct atcgaattag ggtagtaaa agggtcctaa ggaacagcga
2280

tgtaggtggg cgggccaaga taggggcgcg attgctgcga tctggaggac aaattacaca
2340

cacttgcgcc tgagcgccaa gcacagggtt gttggtcctc atattcacga ggtcgctgag
2400

agcacggtgg gctaattgtg ccatgggtag catatactac ccaaatatct ggatagcata
2460

tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata
2520

tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata
2580

ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata
2640

tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatccta atagagatta gggtagtata
2700

tgctatccta atttatatct gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct
2760

atcctaattct atatctgggt agcatatgct atcctaattct atatctgggt agcataggct
2820

atcctaattct atatctgggt agcatatgct atcctaattct atatctgggt agtatatgct
2880

atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaattct atatctgggt agcatatgct
2940

atcctaattct atatctgggt agtatatgct atcctaattct gtatccgggt agcatatgct
3000

atcctcatga taagctgtca aacatgagaa ttaattcttg aagacgaaag ggcctcgtga
3060

tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca
3120

cttttcgggg aaatgtgctg ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata
3180

tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga
3240

gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcgga ttttgccctc
3300

ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg
3360

cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc
3420

ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat
3480

cccgtgttga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact
3540

tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat
3600

tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga
3660

tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc
3720

ttgatcggtg ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga
3780

tgctgcagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag
3840

cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc
3900

gctcgccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt
3960

ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct
4020

acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg
4080

cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg
4140

atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca
4200

tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga
4260

tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa
4320

aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga
4380

aggtaactgg cttcagcaga gcgagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt
4440

taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt
4500

taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat
4560

agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct
4620

tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca
4680

cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag
4740

agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc
4800

gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga
4860

aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca
4920

tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tgataaaccg tattaccgcc tttgagttag
4980

ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagc
5038

<210> 39
<211> 1356

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của HC của Sh741JLH IgG

<400> 39

caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcgag ctgaagaagc ccggcgccag cgtcaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc ggctacttca tgaactgggt gcggcaggcc
120

cctgggcagg gactggagtg gatgggccgc atcaacccca acaacggcga cagcttctac
180

aaccagggct tcaccggccg cttcgtgttc agcctggaca ccagcgtgtc caccgcctac
240

ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360

tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtgc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 40

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của HC của Sh741JLH IgG

<400> 40

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

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

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp

					100						105						110
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
		115					120					125					
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		
		130				135					140						
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
145					150					155					160		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro		
			165						170					175			
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr		
			180					185					190				
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn		
		195					200					205					
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser		
		210				215					220						
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		
225					230					235					240		
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
			245					250					255				
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
			260					265					270				
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
		275					280					285					
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr		
		290				295					300						
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
305					310					315					320		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro		
			325					330					335				
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
			340					345					350				
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
		355					360					365					
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
		370				375					380						
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		

```
<400>          41
cagatgcagc  tggatgcagag  cggcgccgag  gtgaagaaaa  ccggcagcag  cgtcaagggtg
60

tcttgcaagg  ccagcgggcta  caccttcacc  ggctacttca  tgaactgggt  gcgccaggcc
120

cccggccagg  ccctggagtg  gatgggccgc  atcaacccca  acaacggcga  cagcttctac
180

aaccagaagt  tccaggaccg  cgtcaccatc  acccgcgacc  gcagcatgag  caccgcctac
240

atggagctgt  ccagcctgcg  cagcgaggac  accgccatgt  actactgcg  cagggagggc
300

tactacggcg  gcagaggcta  cgccctggac  tactggggcc  agggcaccct  ggtgaccgtg
360

tccagcgcta  gcaccaaggg  cccatcggtc  ttccccctgg  caccctcttc  caagagcacc
420

tctgggggca  cagcggccct  gggctgcttg  gtcaaggact  acttccccga  accggtgacg
480

gtgtcgtgga  actcaggcgc  cctgaccagc  ggcgtgcaca  ctttcccggc  tgtcctacag
540

tcctcaggac  tctactccct  cagcagcgtg  gtgaccgtgc  cctccagcag  cttgggcacc
600
```


cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaaggt acaccctcat gatctcccg
780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 42
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của HC của Sh145JLH IgG

<400> 42
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

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

<210> 43
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của HC của Sh146JLH IgG

<400> 43
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtcaagggtg
 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcaac ggctacttca tgaactgggt gaggcaggcc
 120
 cctgggcagg gactggagt gatgggccc atcaaccca acaacggcga cagcttctac
 180
 aaccagaagt tccagggccg cgtcaccatg acccgcgaca ccagcaccag caccgtgtac
 240

atggagctgt ccagcctgcg cagcgaggac accgccgtgt actactgcg cagggagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360

tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt
660

gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctgggtgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 44
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của HC của Sh146JLH IgG

<400> 44
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr
20 25 30
Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg 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 Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

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

<210> 45
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của HC của Sh434JLH IgG

<400> 45

caggtgcagc tgcaggagag cggccccggc ctggtgaagc ccagccagac cctgagcctg
60

acctgcgccg tctacggagg aagcttcagc ggctacttca tgaactggat caggcagccc
120

cccggaagg gcctggagtg gatcggccgc atcaaccca acaacggcga cttcagctac
180

aaccagagcc tgaagagccg cgtgaccatc agcgtggaca ccagcaagaa ccagttcagc
240

ctgaagctgt ccagcgtgac cgccgccgac accgccgtgt actactgcgc cagggagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360

tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgacct gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccage
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccggtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 46

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của HC của Sh434JLH IgG

<400> 46

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

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

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

Gly	Arg	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Asp	Phe	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ser	Leu
	50					55					60				

Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	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	Arg	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Arg	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		

Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 47
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của LC của Sh112JLL IgG

<400> 47
 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgccg gcgtggggcga ccgcgtgacc
 60

atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggatatca gcagaagccc
 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accagccgcc tgcacagcgg cgtgccctcc
 180

agattctccg gcagcggatc tggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
 300

ggcaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca
 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
 600

ctgagttcac cggtgacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
 642

<210> 48
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của LC của Sh112JLL IgG

<400> 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 49

<211> 751
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự ADN của (mJL1) scFv kháng CD43 ở chuột

<400> 49
 ccatggccga ggttcagctg cagcagctctg gtcctgagct ggtgaagcct ggggcttcag
 60
 tgaagatttc ctgcaaggcc tctgggttact caattgggtg ctactttatg aactgggtga
 120
 agcagagcca cggcaagagc cctgagtgga ttgggcgtat taatcctaac aatgggtgatt
 180
 ctttctacaa ccagaaattc aagggcacgg ccacattgac tgttgaccgc tcttctgaca
 240
 cagtccacat ggaggtcctg agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tattgtggcc
 300
 gcgaaggtta ctacggtggg cgaggggtatg ctttggacta ctgggggtcaa ggcacctcgg
 360
 tcaccgtctc ctcaggcggc ggagctagcg ggggaggagg atccggaggc gggggatctg
 420
 atatccagat gacacagact acatcctccc tgtctgcctc tctgggacgc cgcgtcacca
 480
 tcagctgccg gacaagtcag gacattagca attatttgaa ctggtatcag cagaaaccag
 540
 atggtactgt taaactcctg atctataaca catcacgctt gcaactcaggc gtcccatcac
 600
 ggttcagtgg cagcgggtct ggtacagatt attccctcac cattcgcaac ctggaacaaa
 660
 aagatattgc cacttacttt tgccaacaga gcaatatgtt tccgtacacg ttcggggggg
 720
 ggaccaagct ggaaatcaag cgggcggccg c
 751

<210> 50
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của (mJL1) scFv kháng CD43 ở chuột

<400> 50

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

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly
 20 25 30

Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Pro Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Gly Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ala
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 130 135 140

Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
 145 150 155 160

Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Ser Arg
 180 185 190

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Arg Asn Leu Glu Gln Lys Asp Ile Ala Thr
 210 215 220

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 51
 <211> 751
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của Sh741-112 scFv

<400> 51
 ccatggccca ggtgcagctg gtgcagagcg gcagcgagct gaagaagccc ggcgccagcg
 60
 tcaaggtgtc ctgcaaggcc agcggctaca ccttcaccgg ctacttcatg aactgggtgc
 120
 gccaggcccc tgggcaggga ctggagtgga tgggccgcat caaccccaac aacggcgaca
 180
 gcttctacaa ccagggttc accggccgct tcgtgttcag cctggacacc agcgtgtcca
 240
 ccgcctacct gcagatcagc agcctgaagg ccgaggacac cgccgtgtac tactgcgcca
 300
 gggagggcta ctacggaggg agagggtagc ccctggacta ctggggccag ggcaccctgg
 360
 tgaccgtgtc ctccggcggc ggaggatccg gaggcggggg atctggggga ggagctagcg
 420
 acatccagat gaccagagc ccttcttctg tctccgccag cgtgggagc cgcgtagcca
 480
 tcacctgccg caccagccag gacatcagca actacctgaa ctggtatcag cagaagcccg
 540
 gcaaggcccc caagctgctg atctacaaca ccagcaggct ccaactctgga gtccccagcc
 600
 gcttctccgg ctccgggtct ggaaccgact tcaccctgac catcagctcc ctgcagcccg
 660
 aggacttcgc cacctactac tgccagcaga gcaacatggt cccctacacc ttcgggcagg
 720
 ggaccaagct ggagatcaag cgggcggccg c
 751

<210> 52
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của Sh741-112 scFv

<400> 52

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

<210> 53
 <211> 751
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của Sh145-112 scFv

<400> 53
 ccatggccca gatgcagctg gtgcagagcg gcgccgaggt gaagaaaacc ggcagcagcg
 60
 tcaaggtgtc ctgcaaggcc agcggctaca ccttcaccgg ctacttcatg aactgggtgc
 120
 gccaggcccc cggccaggcc ctggagtgga tgggccgcat caacccaac aacggcgaca
 180
 gcttctacaa ccagaagttc caggaccgcg tcaccatcac ccgcgaccgc agcatgagca
 240
 ccgcctacat ggagctgtcc agcctgcgca gcgaggacac cgccatgtac tactgcgcca
 300
 gggagggcta ctacggcggc agaggctacg ccctggacta ctggggccag ggcaccctgg
 360
 tgaccgtgtc ctccggcggc ggaggatccg gaggcggggg atctggggga ggagctagcg
 420
 acatccagat gaccagagc ccttcttctg tctccgccag cgtgggcgac cgcgtgacca
 480
 tcacctgccg caccagccag gacatcagca actacctgaa ctggtatcag cagaagcccg
 540
 gcaaggcccc caagctgctg atctacaaca ccagcaggct ccactctgga gtccccagcc
 600
 gcttctccgg ctccgggtct ggaaccgact tcaccctgac catcagctcc ctgcagcccg
 660
 aggacttcgc cacctactac tgccagcaga gcaacatggt cccctacacc ttcgggcagg
 720
 ggaccaagct ggagatcaag cgggcggccg c
 751

<210> 54
 <211> 245
 <212> PRT

Leu Glu Ile Lys Arg
245

<210> 55
 <211> 751
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của Sh146-112 scFv

<400> 55
 ccatggccca ggtgcagctg gtgcagagcg gcgccgaggt gaagaagccc ggcgccagcg
 60
 tcaaggtgtc ctgcaaggcc agcggctaca ccttcaacgg ctacttcatg aactgggtga
 120
 ggcaggcccc tgggcaggga ctggagtgga tgggccgcat caacccaac aacggcgaca
 180
 gcttctacaa ccagaagttc cagggccgcg tcaccatgac ccgcgacacc agcaccagca
 240
 ccgtgtacat ggagctgtcc agcctgcgca gcgaggacac cgccgtgtac tactgcgcca
 300
 gggagggcta ctacggcggc agaggctacg ccctggacta ctgggggtcaa ggcaccctgg
 360
 tgaccgtgtc cagcggcggc ggaggatccg gaggcggggg atctggggga ggagctagcg
 420
 acatccagat gaccagagc ccttcttctg tctccgccag cgtgggacac cgcgtgacca
 480
 tcacctgccg caccagccag gacatcagca actacctgaa ctggtatcag cagaagcccc
 540
 gcaaggcccc caagctgctg atctacaaca ccagcaggct ccactctgga gtccccagcc
 600
 gcttctccgg ctccgggtct ggaaccgact tcaccctgac catcagctcc ctgcagcccc
 660
 aggacttcgc cacctactac tgccagcaga gcaacatggt cccctacacc ttcgggcagg
 720
 gtacaaagct ggagatcaag cgggcggccg c
 751

<210> 56
 <211> 247

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của Sh146-112 scFv

<400> 56

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

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

Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln
 50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
 130 135 140

Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Ser Arg
 180 185 190

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 57
 <211> 751
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của Sh434-112 scFv

<400> 57
 ccatggccca ggtgcagctg caggagagcg gccccggcct ggtgaagccc agccagaccc
 60
 tgagcctgac ctgcgccgtc tacggaggaa gcttcagcgg ctacttcattg aactggatca
 120
 ggcagccccc cggcaagggc ctggagtgga tcggccgcat caacccaac aacggcgact
 180
 tcagctacaa ccagagcctg aagagccgcg tgaccatcag cgtggacacc agcaagaacc
 240
 agttcagcct gaagctgtcc agcgtgaccg ccgccgacac cgccgtgtac tactgcgcca
 300
 gggagggcta ctacggcggc agaggctacg ccctggacta ctggggccag ggcaccctgg
 360
 tgaccgtgtc cagcggcggc ggaggatccg gaggcggggg atctggggga ggagctagcg
 420
 acatccagat gaccagagc ccttcttctg tctccgccag cgtgggacgac cgcgtgacca
 480
 tcacctgccg caccagccag gacatcagca actacctgaa ctggtatcag cagaagcccc
 540
 gcaaggcccc caagctgctg atctacaaca ccagcaggct ccactctgga gtccccagcc
 600
 gcttctccgg ctccgggtct ggaaccgact tcacctgac catcagctcc ctgcagcccc
 660
 aggacttcgc cacctactac tgccagcaga gcaacatggt cccctacacc ttcgggcagg
 720
 gtacaaagct ggagatcaag cgggcggccg c
 751

<210> 58

<211> 245
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của Sh434-112 scFv

<400> 58
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Phe Ser Tyr Asn Gln Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val 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 Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 145 150 155 160
 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys Arg
245

<210> 59
<211> 1356
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự ADN của HC của Sh741JLHP45 IgG

<400> 59
caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcag ctgaagaagc ccggcgccag cgtcaagggtg
60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc ggctacttca tgaactgggt gcgccaggcc
120
cccggacagg ggcccagtg gatgggcccgc atcaaccca acaacggcga cagcttctac
180
aaccagggct tcaccggccg cttcgtgttc agcctggaca ccagcgtgtc caccgcctac
240
ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagggc
300
tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360
tccagcgtta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc
420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag
540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660
gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 60
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của HC của Sh741JLHP45 IgG, trong đó gốc axit amin thứ 45 được thay thế bằng P

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

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 61
<211> 1356
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự ADN của HC của Sh145JLHP45 IgG

<400> 61
cagatgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaaa ccggcagcag cgtcaagggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc ggctacttca tgaactgggt gaggcaggcc
120

cctggacagg ccccgagtg gatggggccgc atcaaccca acaacggcga cagcttctac
180

aaccagaagt tccaggaccg cgtcaccatc acccgcgacc gcagcatgag caccgcctac
240

atggagctgt ccagcctgcg cagcgaggac accgcatgt actactgcg cagggagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg
360

tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt
660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaag acaccctcat gatctcccg
780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 62
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin biến thể HC của Sh145JLHP45 IgG (gốc 45 được thay thế bằng P)

<400> 62

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

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

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 63
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự ADN biến thể của LC của Sh112JLV44 IgG

<400> 63
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga ccgcgtgacc
60

atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccg tgaagctgct gatctacaac accagccgcc tgcacagcgg cgtgccctcc
180

agattctccg gcagcggatc tggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
300

ggcaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagttcac cggtgacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
642

<210> 64
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin biến thể LC của Sh112JLV44 IgG (gốc 44 được thay thế bằng V)

<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 65
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của CDhRZ7VHKb (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 65
 gaggtgcagc tgggtccagag cggcgccgag gtcaagaagc ctggcgccac cgtcaagatc
 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcagc ggctacttca tgaactgggt ccgccaggcc
 120

ccaggcaagg gactggagtg gatggggccgc atcaacccca acaacggcga cagcttctac
 180

aaccagaagt tcaagggccg cgtcaccatc accgccgaca ccagcaccga caccggctac
 240

ctggagctgt ccagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cgccgagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgtccgtg
360

agcagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt
660

gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 66
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của CDhRZ7VHKb (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Gly Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

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

<210> 67
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của CDhRZ7VH_KbR73 (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 67

gaggtgcagc tgggtccagag cggcgccgag gtcaagaagc ctggcgccac cgtcaagatc
60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcagc ggctacttca tgaactgggt ccgccaggcc
120

ccaggcaagg gactggagtg gatggggcgc atcaacccca acaacggcga cagcttctac
180

aaccagaagt tcaagggccg cgtcaccatc accgccgacc gcagcaccga caccggctac
240

ctggagctgt ccagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cgccgagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgtccgtg
360

agcagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt
660

gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg
780

acccttgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtgc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccggtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 68

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDhRZ7VH_KbR73 (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 68

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

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

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 69
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của CDhL7IVHKb (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 69
 gaggtgcagc tggctcgagag cggcgggggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgcgcctg
 60

agctgcgcgc ccagcggcctt caccttcacc ggctacttca tgaactgggt ccgccaggcc
 120

ccagggaaag gcctggagtg ggtggccgc atcaaccca acaacggcga cagcttctac
 180

aaccagaagt tcaagggccg cttcaccctg agcgtggacc gcagcaagaa caccctgtac
 240

ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc
 300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg
 360

tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
 420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
 600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 70
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của CDhL7IVHKb (Các biến thể IgG được nhân
hóa được bảo tồn)

<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 71
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của CDhRZ7VHAM (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 71
 gaggtgcagc tgggtccagag cggcgccgag gtcaagaagc ctggcgccac cgtcaagatc
 60
 agctgcaagg ccagcggcta cagcatcggc ggctacttca tgaactgggt ccgccaggcc
 120
 ccaggcaagg gactggagtg gatggggccgc atcaacccca acaacggcga cagcttctac
 180
 aaccagaagt tcaagggccg cgtcaccatc accgccgaca ccagcaccga caccggctac
 240

ctggagctgt ccagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cgccgagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgtccgtg
360

agcagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaag acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 72
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của CDhRZ7VHAM (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 72
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
20 25 30
Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Gly Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

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

<210> 73
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của CDhRZ7VHAMR73 (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 73

gagggtgcagc tgggtccagag cggcgccgag gtcaagaagc ctggcgccac cgtcaagatc
60

agctgcaagg ccagcggcta ctccatcggc ggctacttca tgaactgggt ccgccaggcc
120

ccaggcaagg gactggagtg gatggggcgc atcaaccca acaacggcga cagcttctac
180

aaccagaagt tcaagggcgc cgtcaccatc accgccgacc gcagcaccga caccggctac
240

ctggagctgt ccagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cgccgagggc
300

tactacggcg gcagaggcta cgccctggac tactggggcc agggcaccct ggtgtccgtg
360

agcagcgcta gcaccaaggc cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg
780

acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtgc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctgggtgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 74

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDhRZ7VHAMR73 (Các biến thể IgG được nhân hóa được bảo tồn)

<400> 74

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

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

86

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt
660

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccacgt gccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaaggt acaccctcat gatctcccg
780

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg
1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccggtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 76

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDhL7IVHAM (Các biến thể IgG được nhân
hóa được bảo tồn)

<400> 76

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

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

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

<210> 77
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của CDhRZ7Vk (biến thể chuỗi nhẹ)

<400> 77
 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc
 60
 atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accagccgcc tgcacagcgg cgtgcctcc
 180
 agattctccg gcagcggatc tggcaccgac ttcagcctga ccatcaatag cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggcggc
300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagttcac cggtgacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
642

<210> 78

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDhRZ7Vk (biến thể chuỗi nhẹ)

<400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

<210> 79
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của CDhRZ7VkFS (biến thể chuỗi nhẹ)

<400> 79
 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc
 60
 atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accagccgcc tgcacagcgg cgtgccttcc
 180
 agattctccg gcagcggatc tggcaccgac ttcagcctga ccatccgcag cctgcagccc
 240
 aaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggcggc
 300
 ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga
 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagttcac cggtgacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
642

<210> 80

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của CDhRZ7VkFS (biến thể chuỗi nhẹ)

<400> 80

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 81
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của CDhL7IVk (biến thể chuỗi nhẹ)

<400> 81
 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtccgcca gcgtgggcga ccgcgtgacc
 60

atcacctgcc gcaccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc
 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accagccgcc tgcacagcgg cgtgccttcc
 180

agattctccg gcagcggatc tggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcaacatgt tcccctacac cttcggccag
 300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga
 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
 600

ctgagttcac cggtgacaaa gagcttcaac aggggagagt gt
 642

<210> 82
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của CDhL7IVk (biến thể chuỗi nhẹ)

<400> 82
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 83

<211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của sh146-112

<400> 83
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg 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 Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 84
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 36-10 Q6R

<400> 84
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

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

96

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 324-B10

<400> 86

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Arg Ser Thr Ser Thr Val 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 Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 361-C11

<400> 87

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

<220>
<223> vùng biển đổi chuỗi nặng (VH) của 368-G07

<400>															88	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Gly	Gly	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Arg	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Asp	Ser	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	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	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Arg	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	
			100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120									

<210> 89
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 369-F05

<400> 89
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met 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 Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 90
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 361-H05

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

85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 91
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của thể đột biến quikchange

 <400> 91
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg Asp Arg Ser Thr Ser Thr Met 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 Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 92
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 45-37

 <400> 92

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

<210> 93

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 257-10

<400> 93

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

100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 94
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 456-D10

<400> 94
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Pro Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 95
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của sh146-112

<400> 95
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

<210> 96
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 36-10 Q6R

<400> 96
 Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 97
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 153-28

<400> 97

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 324-B10

<400> 98

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 99
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 361-C11

<400> 99
 Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 100
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 368-G07

<400> 100
 Asp Ile Gln Met Thr Arg Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Pro Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

106

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 361-H05

<400> 102

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 103

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của thể đột biến quikchange

<400> 103

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

Gly Arg Val Pro Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 104
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 45-37

<400> 104
Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 105
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 257-10

<400> 105
Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

<210> 106
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 456-D10

<400> 106
 Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

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

<220>
 <223> Biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) (được khử glycosyl hóa)

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biên thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) (được khử glycosyl hóa)

<400> 108

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Gln Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 109
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biền thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được khử glycosyl hóa)

<400> 109
 Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 110
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)
 <223> Xaa là Phe (F) hoặc Tyr (Y)

<220>
 <223> CDRH1 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 110
 Gly Tyr Xaa Met Asn
 1 5

<210> 111
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH1 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 111
 Gly Tyr Phe Met Asn
 1 5

<210> 112
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH1 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 112
 Gly Tyr Tyr Met Asn
 1 5

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)
 <223> Xaa là Asn (N) hoặc Ser (S)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Xaa là Gln (Q) hoặc Lys (K)

<220>
 <223> CDRH2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 113
 Arg Ile Asn Pro Asn Xaa Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa
 1 5 10 15

Gly

<210> 114
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 114
 Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 115
 Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 116
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 116
 Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 117
 Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 118
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRH3 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 118
 Glu Gly Tyr Tyr Gly Gly Arg Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 119
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL1 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 119
 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 120

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Xaa là Asn (N) hoặc Gln (Q)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)
 <223> Xaa là Ser (S) hoặc Ala (A)

<220>
 <223> CDRL2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 120
 Xaa Thr Xaa Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 121
 Asn Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 122
 Asn Thr Ala Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 123
 Gln Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL2 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 124
 Ala Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 125
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL3 của kháng thể kháng CD43 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

<400> 125
 Gln Gln Ser Asn Met Phe Pro Tyr
 1 5

<210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)
 <223> Xaa là Gly (G) hoặc Ala (A)

<220>
 <223> tác nhân liên kết

<400> 126
 Gly Gly Gly Xaa Ser
 1 5

<210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tác nhân liên kết

<400> 127
 Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tác nhân liên kết

<400> 128
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 129
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit chứa epitop, DN2

<400> 129
 Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile Gly Ala Ser Thr Gly Ser Cys
 1 5 10 15

<210> 130

<211> 400
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD43 ở người

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

```
<220>
<223>      epitop
```


<400> 132
Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> epitop

<400> 133
Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> epitop

<400> 134
Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile
1 5