



(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)



1-0051518

(51)^{2021.01} C07K 16/18; A61K 47/54; A61K 47/65; (13) B
A61P 35/00; A61P 37/02; A61K 38/07;
A61K 47/68

(21) 1-2022-04308

(22) 15/12/2020

(86) PCT/CN2020/136396 15/12/2020

(87) WO/2021/121204 24/06/2021

(30) 201911294912.3 16/12/2019 CN

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/12/2022 417A

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

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

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

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

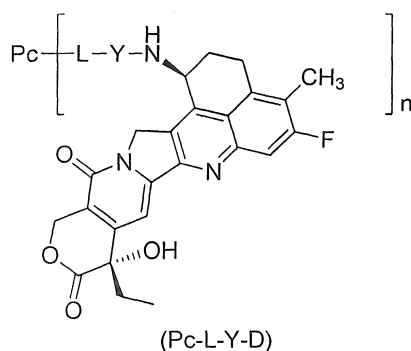
(72) YING, Hua (US); MAO, Langyong (CN); WANG, Sijia (CN).

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

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

(21) 1-2022-04308

(57) Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể kháng CEA-chất tương tự exatecan. Cụ thể là, thể liên hợp kháng thể kháng CEA-chất tương tự exatecan là như được thể hiện trong công thức chung (Pc-L-Y-D), trong đó Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó; L là đơn vị liên kết; Y được chọn từ $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$, $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^1R^2-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$, và $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$; và n là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể kháng CEA-chất tương tự exatecan, phương pháp sản xuất thể liên hợp này, được phẩm chứa thể liên hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự trình bày ở đây chỉ cung cấp thông tin cơ bản có liên quan đến sáng chế và không nhất thiết tạo nên giải pháp kỹ thuật.

Kháng nguyên ung thư phôi (Carcinoembryonic antigen-CEA, cũng được biết đến là CEACAM-5 hoặc CD66e), một glycoprotein có khối lượng phân tử bằng 180 kDa, là một trong những kháng nguyên có liên quan đến khối u được phát hiện sớm nhất. CEA là một thành viên của siêu họ globulin miễn dịch và chứa 7 miền gắn kết với màng tế bào thông qua phân tử neo glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Thompson J.A., *J Clin Lab Anal.* 5:344–366, 1991). CEA ban đầu được phát hiện và báo cáo bởi Gold P và Freedman SO trong dịch chiết mô ung thư đại tràng (Gold và Freedman 1965; Gold và Freedman, 1965), và CEA sau đó được báo cáo là được phát hiện trong huyết thanh của người bệnh bị ung thư đại tràng và các khối u khác nhờ phương pháp thử nghiệm miễn dịch phóng xạ nhạy cảm, trong khi đó hàm lượng CEA trong huyết thanh của người khỏe mạnh hoặc các bệnh nhân bị các bệnh khác là cực kỳ thấp (Thomson, Krupey et al., 1969). Sự biểu hiện CEA tăng lên ở các tế bào ung thư, và CEA tăng thúc đẩy sự kết dính giữa các tế bào và cả sự di căn tế bào (Marshall J., *Semin Oncol.*, 30(Suppl. 8):30-6, 2003). CEA thường được biểu hiện trong các biểu mô, kể cả các tế bào trong đường dạ dày ruột, đường hô hấp và đường sinh dục niệu, và các tế bào ở đại tràng, cổ tử cung, tuyến mô hôi và tuyến tiền liệt (Nap et al, *Tumour biol.*, 9(2-3):145-53, 1988; Nap et al, *Cancer Res.*, 52(8):2329-23339, 1992).

Thể liên hợp kháng thể dược chất (Antibody drug conjugate-ADC) liên kết kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể với độc tố tế bào có hoạt tính sinh học thông qua một hóa chất liên kết ổn định, tận dụng được triệt để tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể với các kháng nguyên bề mặt của các tế bào bình thường và tế bào khối u và hiệu quả cao của chất gây độc tế bào, và đồng thời tránh được nhược điểm tác dụng

điều trị kém của thể liên hợp trước đó, nhược điểm có tác dụng phụ gây độc nghiêm trọng và nhược điểm tương tự. Điều này có nghĩa là thể liên hợp kháng thể được chất có thể có thể gắn kết với các tế bào khối u chính xác hơn và có tác dụng giảm trên các tế bào bình thường so với các dược chất hóa trị liệu thông thường đã biết.

Hiện nay, một vài kháng thể nhằm vào CEA và thuốc ADC đã được báo cáo trong các patent, như công bố đơn quốc tế số WO2015069430. Tuy nhiên, hiện vẫn còn nhu cầu phát triển thể liên hợp dược chất kháng thể kháng CEA an toàn hơn và có hiệu quả hơn dùng để điều trị các khối u có liên quan đến CEA tốt hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp dược chất kháng thể kháng CEA và sử dụng chúng làm thuốc, trong đó thể liên hợp dược chất kháng thể kháng CEA bao gồm kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được liên hợp với dược chất độc tùy ý bằng chất liên kết, trong đó kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó:

i) HCDR1 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR1 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7, và HCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc khác nhau bởi một axit amin; LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là giống với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 8;

ii) HCDR1 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR1 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9, và HCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc khác nhau bởi một axit amin; LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là giống với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 10;

iii) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 11; LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là giống với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 12; hoặc

iv) HCDR1 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR1 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 13, và HCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với HCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 13 hoặc khác nhau bởi một axit amin; LCDR1 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là giống với LCDR1 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 14, và LCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là giống với LCDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 14 hoặc khác nhau bởi một axit amin.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

v) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng; hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 17, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng;

vi) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng; hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 23, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng;

vii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32, tương ứng; hoặc

viii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34, tương ứng, và HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 38; vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 37 và LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 36 hoặc SEQ ID

NO: 64.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

Theo một số phương án, kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 34, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 và SEQ ID NO: 37, tương ứng; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 34, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 và SEQ ID NO: 37, tương ứng; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 34, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 64 và SEQ ID NO: 37, tương ứng; hoặc

tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 34, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 64 và SEQ ID NO: 37, tương ứng.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA trong thể liên hợp kháng thể được chất là kháng thể chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một trong số các phương án nêu trên trong thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ

ID NO: 7; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8; hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10; hoặc

(c) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(e) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39, 40, 41 hoặc 42, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 39, 40, 41 hoặc 42; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43, 44, 45 hoặc 46, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 43, 44, 45 hoặc 46;

tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44; hoặc

(f) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 hoặc 52, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự

axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 hoặc 52; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53, 54 hoặc 55, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 53, 54 hoặc 55;

tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53; hoặc

(g) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56, 57 hoặc 58, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 56, 57 hoặc 58; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 hoặc 63, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 hoặc 63;

tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62; hoặc

(h) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65, 66, 67 hoặc 68, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 65, 66, 67 hoặc 68; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 hoặc 76, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% đồng nhất với một trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 hoặc 76;

tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 68, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA theo một trong số các phương án nêu trên trong thể liên hợp kháng thể được chất là kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung thu được từ kháng thể người hoặc biến thể vùng khung của nó, và biến thể vùng khung của nó có các đột biến ngược có tối đa 10 axit amin trong vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người;

tốt hơn là, biến thể vùng khung của nó được chọn từ vùng khung bất kỳ nêu trong các mục (i) đến (l) dưới đây:

(i) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 46P, 47W, 49Y, 70S và 71Y, và/hoặc vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 38 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 38K và 46K;

(j) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2V, 42G, 44V và 71Y, và/hoặc vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 47 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F và 82A R;

(k) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 3V, 43P và 58V, và/hoặc vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 38K, 66K và 71V; và

(l) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, LCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36 hoặc SEQ ID NO: 64 và LCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D và 87I; và/hoặc vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 38 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2I, 38K và 46K;

(m) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và

LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2V, 42G, 44V và 71Y, và/hoặc vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 47 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F và 82A R;

trong đó các vị trí của các đột biến ngược được đánh số theo sơ đồ đánh số Kabat.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA theo một trong số các phương án nêu trên trong thể liên hợp kháng thể được chất là kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung thu được từ kháng thể người hoặc biến thể vùng khung của nó, và biến thể vùng khung này có các các đột biến ngược gồm tối đa 10 axit amin trong vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người;

tốt hơn là, biến thể vùng khung của nó được chọn từ vùng khung bất kỳ nêu trong các mục (i) đến (l) dưới đây:

(i) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 46P, 47W, 49Y, 70S và 71Y, và/hoặc

vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 38 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 38K và 46K;

(j) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2V, 42G, 44V và 71Y, và/hoặc

vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 47 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, bao gồm một hoặc nhiều đột

biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F và 82A R;

(k) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 3V, 43P và 58V, và/hoặc

vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29, tương ứng, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 38K, 66K và 71V; và

(l) vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, LCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36 hoặc SEQ ID NO: 64 và LCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D và 87I; và/hoặc

vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 38 và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34, bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2I, 38K và 46K;

trong đó các vị trí của các đột biến ngược được đánh số theo sơ đồ đánh số Kabat.

Theo một vài phương án của sáng chế, kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một trong số các phương án nêu trên trong thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể; tốt hơn là, vùng cố định chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các vùng cố định của IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 người, và vùng cố định chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các vùng cố định chuỗi κ và λ của kháng thể người; tốt hơn nữa là, kháng thể bao gồm vùng cố định chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 và vùng cố định chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78 hoặc SEQ ID NO: 79;

tốt nhất là, kháng thể kháng CEA được sử dụng trong sáng chế bao gồm:

(m) chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó, và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81 hoặc

trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó;

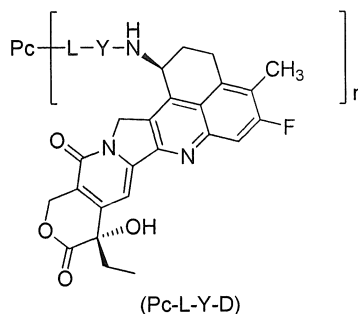
(n) chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó, và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó;

(o) chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó, và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 85 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó; hoặc

(p) chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 86 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó, và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 87 hoặc trình tự có ít nhất 85% đồng nhất với nó.

Theo một vài phương án của sáng chế, đoạn gắn kết kháng nguyên theo một trong số các phương án nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được dime hóa (diabody) và vùng V được làm ổn định nhờ liên kết disulfua (dsFv).

Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên là thể liên hợp kháng thể được chất có công thức chung (Pc-L-Y-D):



trong đó:

Y được chọn từ nhóm bao gồm -O-(CR^aR^b)_m-CR¹R²-C(O)-, -O-CR¹R²-(CR^aR^b)_m-, -O-CR¹R²-, -NH-(CR^aR^b)_m-CR¹R²-C(O)- và -S-(CR^aR^b)_m-CR¹R²-C(O)-;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đoteri, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxy, hydroxy, amino, xyano, nitro, hydroxyalkyl, xycloalkyl và heteroxyclyl; hoặc, R^a và R^b, cùng với các nguyên tử cacbon được liên kết với nó, tạo thành xycloalkyl và heteroxyclyl;

R¹ được chọn từ nhóm bao gồm halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa,

xycloalkyl, xycloalkylalkyl, alkoxyalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl; R^2 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, haloalkyl, alkyl được đơteri hóa, xycloalkyl, xycloalkylalkyl, alkoxyalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl; hoặc, R^1 và R^2 , cùng với các nguyên tử cacbon được liên kết với nó, tạo thành xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

hoặc, R^a và R^2 , cùng với các nguyên tử cacbon được liên kết với nó, tạo thành xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4;

n là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10;

L là đơn vị liên kết;

Pc là kháng thể CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên, n là một số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 0 đến 10, n có thể là giá trị trung bình bằng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 8, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 8, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 4 đến 6, và n là giá trị trung bình của số thập phân hoặc số nguyên.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên, n là giá trị trung bình của số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 3 đến 5.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên, n là giá trị trung bình của số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 7.

Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên là như được thể hiện trong công thức chung (Pc-L-Y-D), trong đó:

Y là $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đơteri, halogen và alkyl;

R^1 là haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

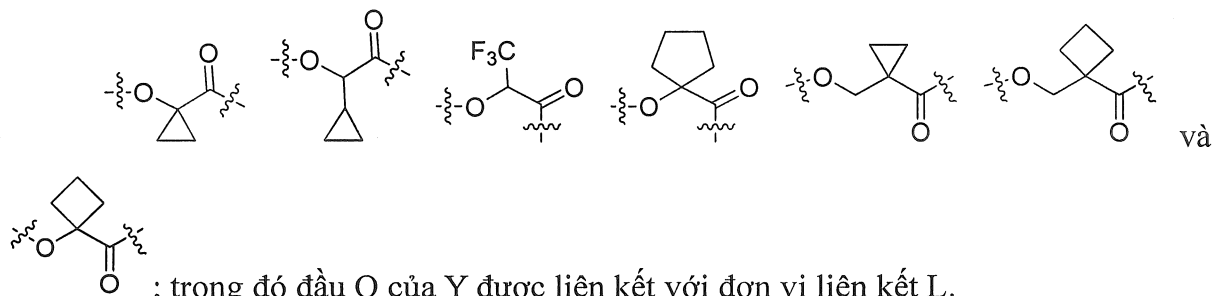
R^2 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và C_{3-6} xycloalkyl;

hoặc, R^1 và R^2 , cùng với các nguyên tử cacbon được liên kết với nó, tạo thành

C₃₋₆ xycloalkyl;

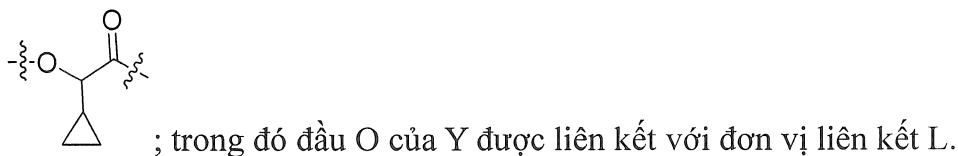
m là 0 hoặc 1.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể dược chất theo một trong số các phương án nêu trên, Y được chọn từ nhóm bao gồm:

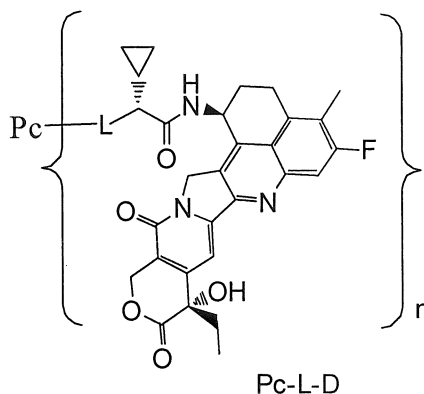


; trong đó đầu O của Y được liên kết với đơn vị liên kết L.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể dược chất theo một trong số các phương án nêu trên, Y là:



Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể dược chất theo một trong số các phương án nêu trên được chọn từ:



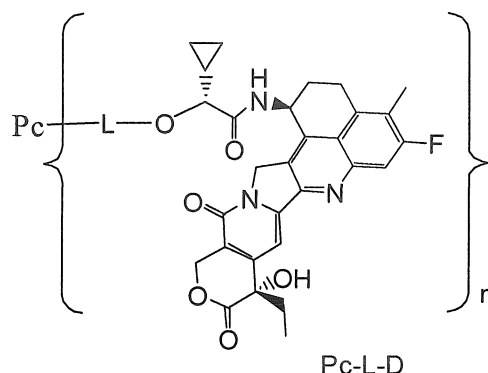
trong đó:

L là đơn vị liên kết;

Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó;

n là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể dược chất theo một trong số các phương án nêu trên được chọn từ:



trong đó:

L là đơn vị liên kết;

Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó;

n là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên, đơn vị liên kết -L- là $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, trong đó:

L^1 được chọn từ nhóm bao gồm $-(\text{succinimidyl-3-yl-}N)\text{-W-C(O)-}$, $-\text{CH}_2\text{-C(O)-NR}^3\text{-W-C(O)-}$ và $-\text{C(O)-W-C(O)-}$, trong đó W được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-8} alkyl, C_{1-8} alkyl-xycloalkyl và heteroalkyl mạch thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, và heteroalkyl có từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó mỗi C_{1-8} alkyl, xycloalkyl và heteroalkyl mạch thẳng độc lập tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl;

L^2 được chọn từ nhóm bao gồm $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{p^1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{p^1}\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{S}(\text{CH}_2)^{p^1}\text{C(O)-}$ và liên kết hóa học, trong đó p^1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

L^3 là gốc peptit có từ 2 đến 7 axit amin, trong đó axit amin được chọn từ các gốc axit amin được tạo thành từ các axit amin từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, citrullin, serin, axit glutamic và axit aspartic, và tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl;

L^4 được chọn từ nhóm bao gồm $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-\text{C(O)NR}^5-$, $-\text{C(O)NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ và liên kết hóa học, trong đó t là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6;

R^3 , R^4 và R^5 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ

nhóm bao gồm hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl;

R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl.

Theo một số phương án, L^1 được chọn từ nhóm bao gồm -(suxinimidyl-3-yl-*N*)-W-C(O)-, -CH₂-C(O)-NR³-W-C(O)- và -C(O)-W-C(O)-, trong đó W được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-C₃₋₆ xycloalkyl và heteroalkyl mạch thẳng có 1 đến 8 nguyên tử trong mạch, và heteroalkyl có từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-C₃₋₆ xycloalkyl hoặc heteroalkyl mạch thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử trong mạch độc lập tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl.

Theo một số phương án, L^2 được chọn từ nhóm bao gồm -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂CH₂C(O)-, -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂C(O)-, -S(CH₂)^{p¹}C(O)- và liên kết hóa học, trong đó ^{p¹} là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20.

Theo một số phương án, L^3 là gốc peptit có từ 2 đến 7 axit amin, trong đó axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin được tạo thành từ các axit amin từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic và axit aspartic, và tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl.

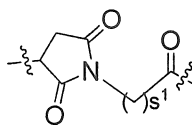
Theo một số phương án, L^4 được chọn từ nhóm bao gồm -NR⁵(CR⁶R⁷)_t-, -C(O)NR⁵-, -C(O)NR⁵(CH₂)_t- và liên kết hóa học, trong đó _t là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

Theo một số phương án, R^3 , R^4 và R^5 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl.

Theo một số phương án, R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl.

Theo một vài phương án của sáng chế, trong thể liên hợp kháng thể được chất

theo một trong số các phương án nêu trên, đơn vị liên kết -L- là -L¹-L²-L³-L⁴-, trong đó:

L¹ là , và s¹ là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

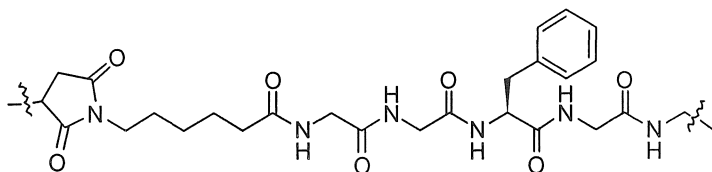
L² là liên kết hóa học;

L³ là gốc tetrapeptit; tốt hơn là, L³ là gốc tetrapeptit của glyxin-glyxin-phenylalanin-glyxin (GGFG, SEQ ID NO: 92);

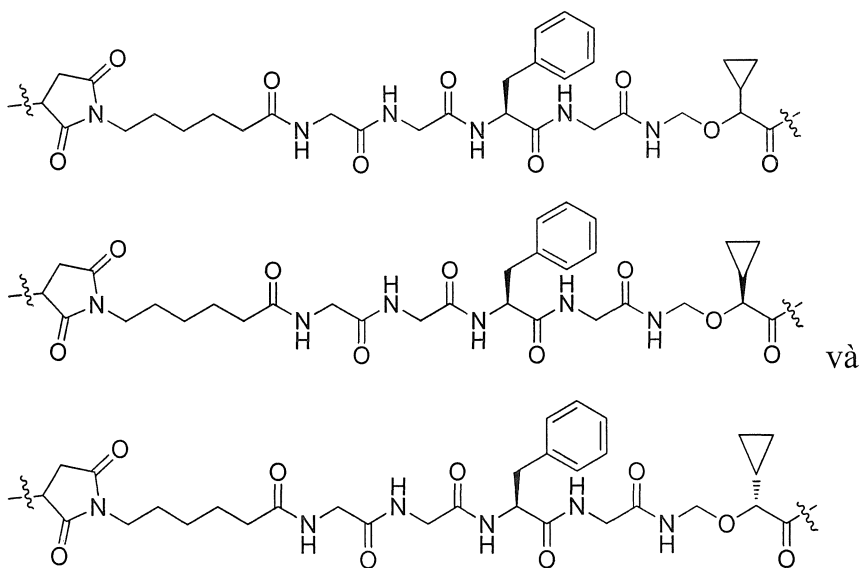
L⁴ là -NR⁵(CR⁶R⁷)t-, trong đó R⁵, R⁶ và R⁷ là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập là hydro hoặc alkyl, và t là 1 hoặc 2;

trong đó đầu L¹ được liên kết với Pc, và đầu L⁴ được liên kết với Y.

Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên là như được thể hiện trong công thức chung (Pc-L-Y-D) hoặc công thức chung Pc-L-D, trong đó -L- là:



Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên là như được thể hiện trong công thức chung (Pc-L-Y-D) hoặc công thức chung Pc-L-D, trong đó -L-Y- tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm:



Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên là thể liên hợp kháng thể được chất có công thức

$$\left\{ \text{Pc} - \left[\text{pyrrolidone} - \text{W} - \text{L}_2 - \text{N}(\text{R}^5) - \text{C}(\text{R}^6)(\text{R}^7) - \text{O} - \left(\text{CH}_2 - \text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} \right)_m \right] - \text{fluorene-9-ylidene-2-hydroxy-2-ethyl-1,3-dioxolane} \right\}_n$$

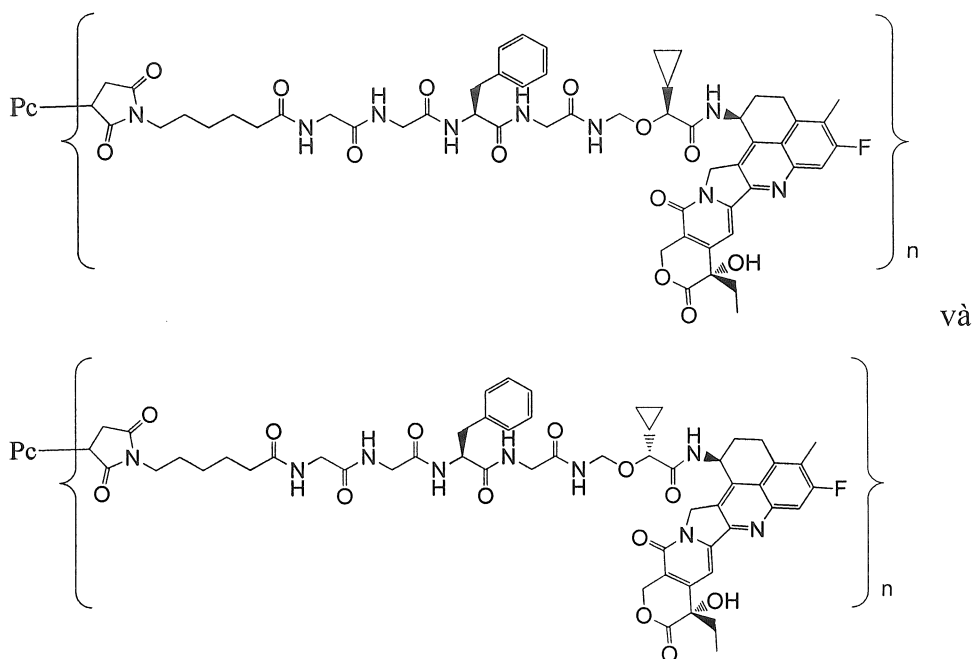
(Pc-L_a-Y-D)

Pc, n, R¹, R² và m là như được nêu trong công thức chung (Pc-L-Y-D).

[illegible]

Pc, R¹, R², R⁵–R⁷, m và n là như được nêu trong công thức chung (Pc-L_a-Y-D).

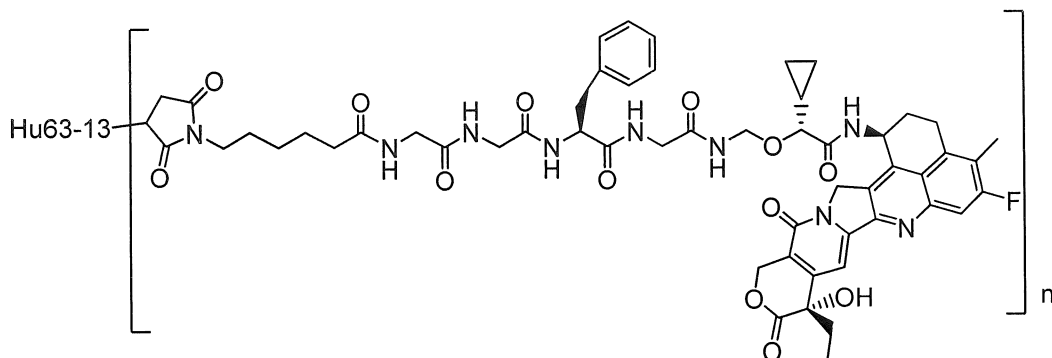
*C1CC(=O)N(CCCCCC(=O)NCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc2ccccc2)C(=O)NCC(=O)NCOCC(C3CC3)C(=O)N[C@@H]4C=C5C(=C6C(=C4)N(C5)C(=O)N6C7C(=O)OC(=O)C7C)C(=O)O[C@H]4C)C(F)=CC=C5C1



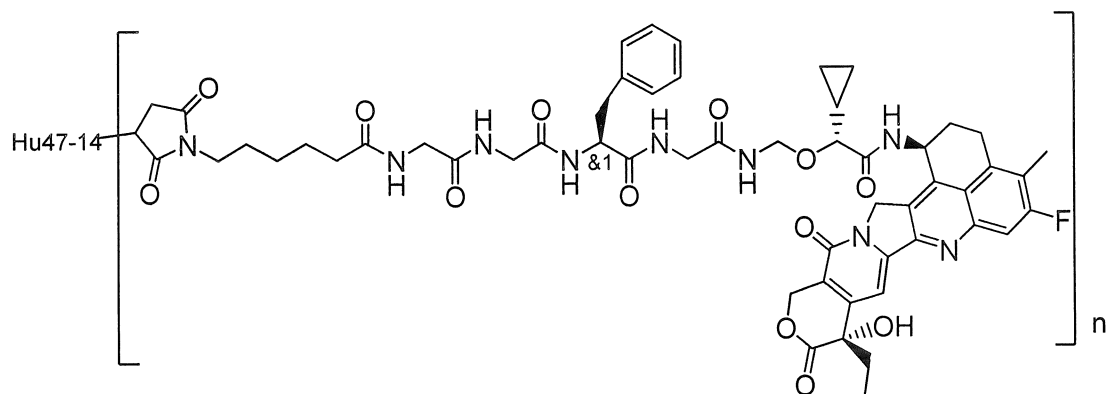
trong đó Pc và n là như được nêu trong công thức chung (Pc-L-Y-D).

Theo một vài phương án của sáng chế, thể liên hợp kháng thể dược chất được chọn từ nhóm bao gồm:

Hu63-13-2-A

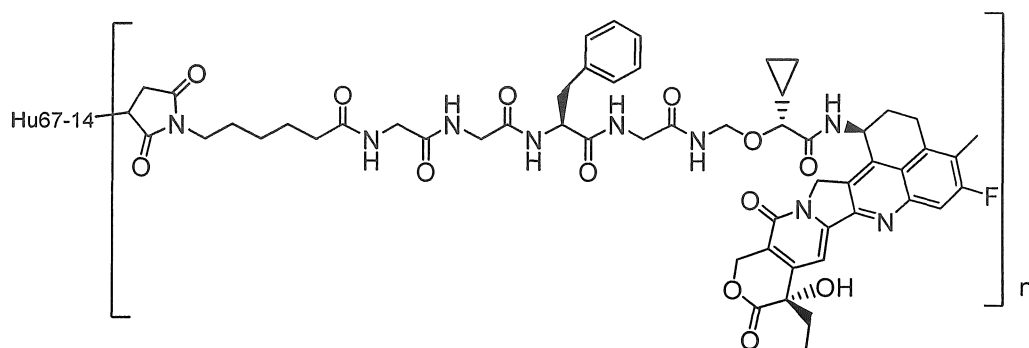


Hu47-14-2-A

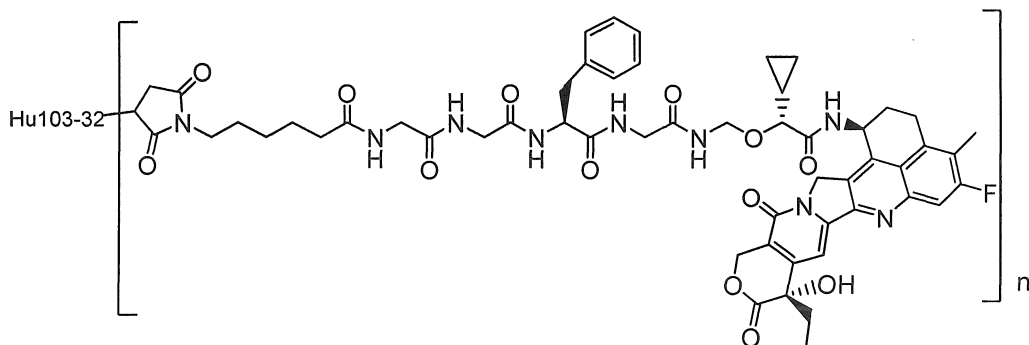


hoặc

Hu67-14-2-A



Hu103-32-2-A



trong đó n là như được nêu trong công thức chung (Pc-L-Y-D);

Các kháng thể được mô tả như sau:

Hu63-13 bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81;

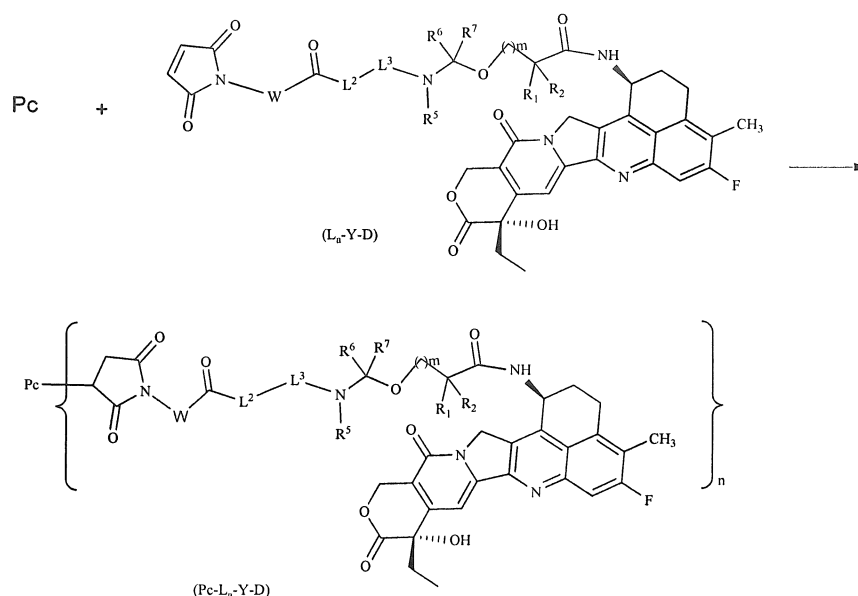
Hu47-14 bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83;

Hu67-14 bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 85;

Hu103-32 bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 86, và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 87.

Tùy ý, n có thể là một số nguyên khác 0 hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 0 đến 10, tốt hơn là số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 1 đến 10; tốt hơn nữa là số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 2 đến 8; và tốt nhất là số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 3 đến 8; tùy ý, n có thể là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 3 đến 5; tùy ý, n là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 7.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất thể liên hợp kháng thể dược chất có công thức chung (Pc-L_a-Y-D), trong đó phương pháp này bao gồm bước sau:

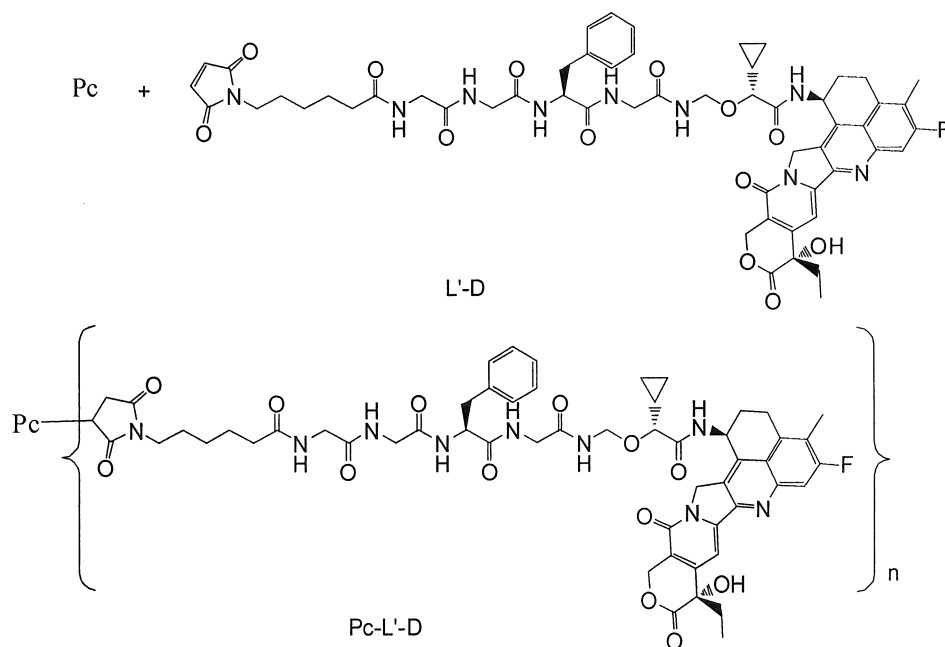


tiến hành phản ứng liên hợp Pc đã khử và hợp chất có công thức chung (L_a-Y-D) để thu được hợp chất có công thức chung (Pc-L_a-Y-D); trong đó:

Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó;

W, L², L³, R¹, R², R⁵-R⁷, m và n là như được nêu trong công thức chung (Pc-L_a-Y-D).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất thể liên hợp kháng thể dược chất có công thức chung (Pc-L'-D), trong đó phương pháp này bao gồm bước sau:



tiến hành phản ứng liên hợp Pc đã khử và hợp chất có công thức chung (L'-D) để thu được hợp chất; trong đó:

Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây;

n là như được nêu trong công thức chung (Pc-L-Y-D).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên và một hoặc nhiều tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên hoặc được phẩm chứa thể liên hợp này làm thuốc.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên hoặc được phẩm chứa thể liên hợp này để sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến CEA. Bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến CEA là bệnh ung thư với mức biểu hiện CEA cao. Hoặc, bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến CEA là bệnh ung thư có mức biểu hiện CEA vừa phải.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên hoặc được phẩm chứa thể liên hợp này để sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa khối u; trong đó khối u và bệnh ung thư tốt hơn là caxinom tế bào vảy đầu và cổ, ung thư đầu và cổ, ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, caxinom hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, ung thư cuống họng, ung thư vòm họng, ung thư thực quản, ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư gan, ung thư gan-mật, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư đường dạ dày ruột, ung thư đường ruột, ung thư đại tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư thận, caxinom tế bào thận tế bào sáng, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư da, u melanin, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư xương, sacom sụn, u tủy, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u Krukenberg, u tăng sinh tủy xương, caxinom tế bào vảy, sarcom Ewing, chứng thoái hóa tinh bột chuỗi nhẹ hệ thống hoặc caxinom tế bào Merkel; tốt hơn nữa là, u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho có nang, u lympho tế bào B lớn trung thất nguyên phát, u lympho tế bào vỏ não, u lympho tế bào lympho nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu các tế bào T/mô bào và u lympho tương bào lympho, ung thư phổi được chọn từ ung thư phổi tế bào không nhỏ hoặc ung thư

phổi tế bào nhỏ, và bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dạng tủy mạn tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mạn tính và bệnh bạch cầu tế bào tủy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa khối u, trong đó phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một liều hữu hiệu để điều trị của thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên hoặc được phẩm chứa thể liên hợp này; trong đó tốt hơn là khối u này là ung thư có liên quan đến việc biểu hiện CEA ở mức cao.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một liều hữu hiệu để điều trị của thể liên hợp kháng thể được chất theo một trong số các phương án nêu trên hoặc được phẩm chứa thể liên hợp này; trong đó tốt hơn là khối u và bệnh ung thư là caxinom tế bào vảy đầu và cổ, ung thư đầu và cổ, ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, caxinom hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, ung thư cuống họng, ung thư vòm họng, ung thư thực quản, ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư gan, ung thư gan-mật, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư đường dạ dày ruột, ung thư đường ruột, ung thư đại tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư thận, caxinom tế bào thận tế bào sáng, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư da, u melanin, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư xương, sacom sụn, u tủy, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u Krukenberg, u tăng sinh tủy xương, caxinom tế bào vảy, sarcom Ewing, chứng thoái hóa tinh bột chuỗi nhẹ hệ thống hoặc caxinom tế bào Merkel; tốt hơn là, u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho có nang, u lympho tế bào B lớn trung thất nguyên phát, u lympho tế bào vỏ não, u lympho tế bào lympho nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu các tế bào T/mô bào và u lympho tương bào lympho, ung thư phổi được chọn từ ung thư phổi tế bào không nhỏ hoặc ung thư phổi tế bào nhỏ, và bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dạng tủy mạn tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu

lympho bào, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mạn tính và bệnh bạch cầu tế bào tủy.

Hoạt chất (ví dụ, thể liên hợp phổi tử-dược chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của chúng) có thể được bào chế ở dạng thích hợp để sử dụng bằng đường thích hợp bất kỳ, tốt hơn là ở dạng liều đơn vị, hoặc ở dạng liều đơn mà có thể được tự sử dụng bởi đối tượng. Liều đơn vị theo sáng chế có thể là viên nén, viên nang, viên nhện, lọ, bột, cốm, viên ngậm, viên đạn, bột hoàn nguyên hoặc chế phẩm dạng lỏng.

Liều sử dụng của hoạt chất hoặc dược phẩm được dùng trong phương pháp điều trị theo sáng chế thường khác nhau theo mức độ nặng của bệnh, cân nặng của đối tượng, và hiệu quả của hoạt chất. Tuy nhiên, theo hướng dẫn chung, liều đơn vị thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1000 mg.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa, ngoài hoạt chất, một hoặc nhiều tá dược được chọn từ nhóm bao gồm: chất độn, chất pha loãng, chất kết dính, chất làm ẩm, chất gây rã, tá dược và chất tương tự. Tùy thuộc vào phương pháp sử dụng, dược phẩm này có thể chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 99% khối lượng.

Kháng thể CEA và thể liên hợp kháng thể dược chất được đề xuất bởi sáng chế có ái lực tốt với các kháng nguyên bề mặt tế bào, hiệu quả nhập bào tốt và hiệu quả ức chế khối u cao cũng như là cửa sổ sử dụng dược chất rộng hơn, và thích hợp để sử dụng dược chất trên lâm sàng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện các kết quả phát hiện FACS của việc gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người với CEA người ở cấp độ tế bào.

FIG.2 thể hiện tác dụng bên ngoài và tính độc tế bào của các phân tử ADC; số liệu chỉ ra rằng toàn bộ các phân tử ADC có tác dụng bên ngoài và tính độc tế bào mạnh, và khi MKN45 và HCT116 được đồng nuôi cấy, các phân tử ADC có thể ức chế sự tăng sinh của cả hai loại tế bào, trong khi đó khi HCT116 được nuôi cấy một mình, các phân tử ADC được liên kết với 2-A về cơ bản lại không độc với các tế bào.

FIG.3 thể hiện tác dụng của các phân tử ADC đối với thể tích khối u trên mô hình ghép ngoại lai LS174T; số liệu chỉ ra rằng toàn bộ các phân tử ADC đều có tác dụng trong việc ức chế sự tăng thể tích khối u so với nhóm đối chứng (PBS), và các tác dụng ức chế trên khối u ở nhóm 3-mpk là tốt hơn so với nhóm 1-mpk; trong số các

nhóm 3-mpk, Hu63-13-2-A có tác dụng ức chế tốt nhất đối với khối u, sau đó là Hu47-14-2-A và sau đó Hu67-14-2-A, và Lmab-CL2A-SN38 có tác dụng ức chế kém nhất trên các khối u.

FIG.4 thể hiện tác dụng của các phân tử ADC đối với khối lượng khối u ở mô hình khối u ghép ngoại lai LS174T; số liệu chỉ ra rằng toàn bộ các phân tử ADC đều có hiệu quả trong việc ức chế sự tăng khối lượng khối u ở cả liều cao và liều thấp so với nhóm đối chứng (PBS); trong số đó các nhóm 3-mpk, Hu63-13-2-A có tác dụng ức chế tốt nhất trên khối u, sau đó là Hu47-14-2-A và sau đó là Hu67-14-2-A, và Lmab-CL2A-SN38 có tác dụng ức chế kém nhất trên các khối u.

FIG.5 thể hiện tác dụng của các phân tử ADC đối với thể tích khối u trên mô hình ghép ngoại lai MKN45; số liệu chỉ ra rằng toàn bộ các phân tử ADC đều có tác dụng trong việc ức chế sự tăng thể tích khối u so với nhóm đối chứng (PBS), và các tác dụng ức chế trên khối u ở nhóm 3-mpk là tốt hơn so với nhóm 1-mpk; trong số đó các nhóm 3-mpk, Hu67-14-2-A có tác dụng ức chế tốt nhất đối với khối u, sau đó là Hu103-32-2-A và sau đó Hu63-13-2-A, và Lmab-CL2A-SN38 có tác dụng ức chế kém nhất trên các khối u.

FIG.6 thể hiện tác dụng của các phân tử ADC đối với khối lượng khối u ở mô hình khối u ghép ngoại lai MKN45; số liệu này chỉ ra rằng toàn bộ các phân tử ADC có tác dụng ức chế việc tăng khối lượng khối u ở cả liều cao và liều thấp so với nhóm đối chứng (PBS); trong số đó các nhóm 3-mpk, Hu67-14-2-A có tác dụng ức chế tốt nhất trên các khối u, sau đó là Hu103-32-2-A và sau đó là Hu63-13-2-A, và Lmab-CL2A-SN38 có tác dụng kém nhất trên các khối u.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Thuật ngữ

Trừ khi được quy định theo cách khác, toàn bộ các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng ở đây có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà sáng chế thuộc về. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả ở đây. Để mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, các thuật ngữ sau được sử dụng phù hợp với các định nghĩa dưới đây.

Khi tên thương mại được sử dụng trong sáng chế, được dự định là bao gồm cả chế phẩm của sản phẩm thương mại dưới tên thương mại, và sản phẩm không được cấp patent và được chất của sản phẩm thương mại dưới tên thương mại.

Trừ khi được quy định theo cách khác, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ có nghĩa sau.

Thuật ngữ "dược chất" được dùng để chỉ hoá chất mà có thể làm thay đổi hoặc xác định được sinh lý học sinh vật và tình trạng bệnh học và có thể được sử dụng để ngăn ngừa, chẩn đoán và điều trị bệnh. Dược chất bao gồm dược chất gây độc tế bào. Không có ranh giới rõ ràng giữa dược chất và chất gây độc. Chất gây độc được dùng để chỉ hóa chất mà có tác dụng độc lên sinh vật và có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người ngay cả với liều nhỏ. Dược chất bất kỳ với liều lớn có thể gây ra các đáp ứng độc.

Dược chất gây độc tế bào được dùng để chỉ dược chất mà ức chế hoặc ngăn ngừa các chức năng của tế bào và/hoặc gây chết tế bào hoặc phá hủy tế bào. Về nguyên tắc dược chất gây độc tế bào có thể tiêu diệt các tế bào khối u ở nồng độ đủ cao; tuy nhiên, do thiếu tính đặc hiệu, nên dược chất gây độc tế bào có thể gây ra sự chết theo chương trình ở các tế bào bình thường đồng thời cũng tiêu diệt các tế bào khối u, dẫn đến các tác dụng phụ nghiêm trọng. Dược chất gây độc tế bào bao gồm các độc tố, như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, đồng vị phóng xạ (ví dụ, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} và đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu), các dược chất gây độc, dược chất hóa trị liệu, kháng sinh và enzym phân giải nhân.

Thuật ngữ "đơn vị liên kết", "phân tử liên kết" hoặc "đoạn liên kết" được dùng để chỉ đoạn cấu trúc hóa học hoặc liên kết, mà được liên kết với phối tử ở một đầu và được liên kết với dược chất ở đầu còn lại, và cũng có thể được liên kết với các phân tử liên kết khác và sau đó liên kết với dược chất.

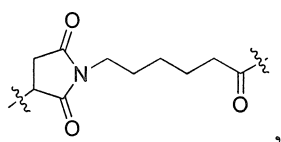
Phân tử liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần liên kết. Các thành phần liên kết được lấy làm ví dụ bao gồm 6-maleimidocaproyl ("MC"), maleimidopropionyl ("MP"), valin-xitrullin ("val-cit" hoặc "vc"), alanin-phenylalanin ("ala-phe"), *p*-aminobenzyloxycarbonyl ("PAB"), *N*-succinimidyl 4-(2-pyridylthio)pentanoat ("SPP"), *N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidoethyl)xyclohexan-1 carboxylat ("SMCC", cũng được dùng để chỉ ở đây là "MCC"), và

N-succinimidyl(4-iodo-axetyl)aminobenzoat ("SIAB"). Phân tử liên kết này có thể bao gồm phân tử kéo dài, phân tử đệm và các đơn vị axit amin, và có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các phân tử liên kết được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US2005-0238649A1. Phân tử liên kết có thể là "phân tử liên kết phân cắt được" thuận lợi cho việc giải phóng được chất trong tế bào. Ví dụ, phân tử liên kết không bền với axit (ví dụ, hydrazon), phân tử liên kết nhạy với proteaza (ví dụ, nhạy với peptidaza), phân tử liên kết không bền với ánh sáng, phân tử liên kết chứa dimetyl hoặc phân tử liên kết chứa disulfua có thể được sử dụng (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127–131(1992); Patent Mỹ số 5,208,020).

Các thuật ngữ viết tắt

Các thành phần liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

MC = 6-maleimidocaproyl, có cấu trúc:



Val-Cit hoặc "vc" = valin-xitrullin (dipeptit được lấy làm ví dụ trong phân tử liên kết phân cắt được bằng proteaza),

xitrullin = axit 2-amino-5-ureidopentanoic,

PAB = *p*-aminobenzyloxycarbonyl (một ví dụ về các thành phần liên kết "tự hủy"),

Me-Val-Cit = *N*-etyl-valin-xitrullin (trong đó liên kết peptit trong phân tử liên kết đã được cải biến để ngăn không bị phân cắt bởi cathepsin B),

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproyl-polyetylen glycol (có thể gắn kết với kháng thể xystein),

SPP = *N*-succinimidyl 4-(2-pyridylthio)valerat,

SPDP = *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat,

SMCC = succinimidyl-4-(*N*-maleimidometyl)xyclohexan-1-carboxylat,

IT = iminothiolan.

Thuật ngữ "thể liên hợp kháng thể dược chất" có nghĩa là kháng thể dược liên kết với dược chất có hoạt tính sinh học nhờ đơn vị liên kết ổn định. Theo sáng chế, "thể liên hợp kháng thể dược chất" hoặc thể liên hợp kháng thể-dược chất (antibody-drug conjugate-ADC) có nghĩa là kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể

được liên kết với dược chất gây độc có hoạt tính sinh học nhờ đơn vị liên kết ổn định. Kháng thể có thể được liên hợp với dược chất trực tiếp hoặc thông qua phân tử liên kết. Số phân tử dược chất trung bình được liên hợp với mỗi kháng thể (mức tải dược chất trung bình hoặc mức tải dược chất, mà có thể được biểu diễn dưới dạng n) có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0 đến 20 phân tử dược chất; theo các phương án nhất định, nằm trong khoảng từ 1 đến 10 phân tử dược chất; và theo các phương án nhất định, nằm trong khoảng từ 1 đến 8 phân tử dược chất.

Thuật ngữ "mức tải dược chất trung bình" hoặc "mức tải dược chất" được dùng để chỉ số dược chất gây độc tế bào trung bình được tải trên mỗi phối tử trong các phân tử thể liên hợp kháng thể dược chất, và cũng có thể được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ dược chất so với kháng thể. Mức tải dược chất có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 12, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 10, các dược chất gây độc tế bào mỗi phối tử (Pc). Theo các phương án của sáng chế, mức tải dược chất được biểu diễn dưới dạng n , mà cũng có thể được dùng để chỉ là giá trị DAR (tỷ lệ dược chất-kháng thể), và các giá trị được lấy làm ví dụ có thể là trung bình của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10. Số trung bình của các dược chất mỗi phân tử ADC sau phản ứng liên hợp có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường như quang phổ học nhìn thấy được/UV, đo phổ khối, thử nghiệm ELISA và HPLC.

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

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng để chỉ globulin miễn dịch, là cấu trúc chuỗi tetrapeptit được tạo thành nhờ liên kết giữa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ bằng liên kết disulfua liên chuỗi. Theo sự khác nhau về thành phần axit amin và thứ tự sắp xếp của các vùng cố định chuỗi nặng, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm lớp, theo cách khác được gọi là isotyp của các globulin miễn dịch, đó là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, với các chuỗi nặng tương ứng của chúng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ , tương ứng. Ig của cùng một lớp có thể được chia thành các lớp phụ khác nhau theo sự khác nhau về thành phần axit amin của vùng bản lề và số lượng và vị trí của các liên kết disulfua của chuỗi nặng; ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các chuỗi nhẹ được phân loại thành các chuỗi κ hoặc λ nhờ các khác biệt trong vùng cố định. Mỗi lớp trong số năm lớp của Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ .

Trong các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể có chiều dài đầy đủ, các trình tự có khoảng 110 axit amin gần đầu N khác nhau đáng kể và do đó được gọi là vùng biến đổi (các vùng Fv); các trình tự axit amin còn lại gần đầu C là tương đối ổn định và do đó được gọi là vùng cố định. Các vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến (hypervariable region-HVR) và 4 vùng khung (framework region-FR) với các trình tự tương đối bảo toàn. Ba vùng siêu biến quyết định tính đặc hiệu của kháng thể và do đó cũng được biết đến là vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region-CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) bao gồm 3 CDR và 4 FR được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Ba CDR của chuỗi nhẹ được dùng để chỉ là LCDR1, LCDR2 và LCDR3, và 3 CDR của chuỗi nặng được dùng để chỉ là HCDR1, HCDR2 và HCDR3.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người hoàn toàn", "kháng thể người đầy đủ" hoặc "kháng thể người hoàn toàn", cũng được biết đến là "kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người hoàn toàn", có cả vùng biến đổi được làm tương thích với người và vùng cố định để loại bỏ tính sinh miễn dịch và tác dụng phụ gây độc. Sự phát triển các kháng thể đơn dòng có bốn giai đoạn, đó là kháng thể đơn dòng của chuột, kháng thể đơn dòng khảm, kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người và kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người đầy đủ. Các công nghệ chính có liên quan để sản xuất kháng thể người đầy đủ bao gồm: công nghệ tế bào lai ở người, công nghệ tế bào lympho B được biến nạp EBV, công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn, công nghệ sản xuất kháng thể chuột chuyển gen, công nghệ sản xuất kháng thể nhờ tế bào B đơn, và công nghệ tương tự.

Thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn của kháng thể mà vẫn giữ được khả năng gắn kết với kháng nguyên. Đã được thể hiện rằng một đoạn của kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể được sử dụng để thực hiện chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Đoạn gắn kết bao gồm trong "đoạn gắn kết kháng nguyên" được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được dime hóa (diabody), vùng V được làm ổn định nhờ liên kết disulfua (dsFv) và các đoạn gắn kết kháng nguyên của peptit chứa các CDR; các ví dụ về các đoạn này bao gồm (i) các đoạn Fab, các đoạn đơn giá gồm các miền VL,

VH, CL và CH1; (ii) các đoạn $F(ab')_2$, các đoạn hai giá gồm hai đoạn Fab được nối với nhau bằng cầu nối disulfua trong các vùng bản lề; (iii) các đoạn Fd gồm các miền VH và CH1; (iv) các đoạn Fv gồm các miền VH và VL của một nhánh của kháng thể; (v) các miền đơn hoặc các đoạn dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544–546) gồm các miền VH; và (vi) các vùng quyết định bổ sung phân lập (CDR) hoặc (vii) các dạng kết hợp của hai hoặc nhiều CDR phân lập mà có thể tùy ý được liên kết với nhau nhờ các phân tử liên kết tổng hợp. Hơn nữa, mặc dù hai miền của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, song chúng có thể được liên kết nhờ phân tử liên kết tổng hợp bằng cách tái tổ hợp, để nó có thể tổng hợp chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH tạo cặp để tạo thành phân tử đơn giá (được dùng để chỉ là Fv chuỗi đơn (scFv); ví dụ, xem tài liệu, Bird et al. (1988) *Science* 242:423–426; và Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879–5883). Các kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được dự định là được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Các đoạn kháng thể như vậy được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được sàng lọc tính hữu ích giống như kháng thể nguyên vẹn. Các phần gắn kết kháng nguyên có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt hóa học hoặc bằng enzym các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Các kháng thể có thể thuộc các isotyp khác nhau, ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, typ phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Nói chung, Fab là một đoạn kháng thể có khối lượng phân tử bằng khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, trong số các đoạn được tạo ra bằng cách xử lý phân tử kháng thể IgG bằng proteaza papain (ví dụ, phân cắt gốc axit amin ở vị trí 224 của chuỗi H), trong đó một phần ở phía đầu N của chuỗi H được kết hợp với chuỗi L nhờ liên kết disulfua.

Nói chung, $F(ab')_2$ là đoạn kháng thể thu được bằng cách phân cắt một phần dưới liên kết disulfua trong vùng bản lề IgG bằng enzym pepsin. Đoạn này có khối lượng phân tử bằng khoảng 100.000, có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, và có hai vùng Fab liên kết với nhau ở vị trí bản lề.

Nói chung, Fab' là đoạn kháng thể có khối lượng phân tử bằng khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, được tạo ra bằng cách phân cắt liên kết disulfua trong vùng bản lề của $F(ab')_2$ được mô tả trên đây.

Ngoài ra, Fab' có thể được tạo ra bằng cách chèn ADN mã hóa đoạn Fab' vào vectơ biểu hiện nhân sơ hoặc nhân thực và đưa vectơ vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thực để biểu hiện Fab'.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn", "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" có nghĩa là phân tử bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (hoặc VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc VL) được liên kết nhờ phân tử liên kết. Các phân tử scFv như vậy có thể có cấu trúc chung: NH₂-VL-phân tử liên kết-VH-COOH hoặc NH₂-VH-phân tử liên kết-VL-COOH. Các phân tử liên kết thích hợp trong giải pháp kỹ thuật đã biết bao gồm các trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc các biến thể của chúng, ví dụ, 1-4 biến thể lặp (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444–6448). Các phân tử liên kết khác mà có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong tài liệu Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725–731; Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94–106; Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055–3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41–56; và Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

Thuật ngữ "CDR" được dùng để chỉ một trong số 6 vùng siêu biến trong miền biến đổi của kháng thể mà chủ yếu góp phần vào việc gắn kết kháng nguyên. Nói chung, có ba CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và ba CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Các ranh giới trình tự axit amin của các CDR có thể được xác định bằng cách sử dụng sơ đồ bất kỳ trong số nhiều sơ đồ đã biết. Một trong số các định nghĩa phổ biến nhất của 6 CDR được đề xuất trong tài liệu Kabat E.A. et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91–3242. Như được sử dụng ở đây, định nghĩa Kabat của các CDR chỉ áp dụng cho CDR1, CDR2 và CDR3 của miền biến đổi chuỗi nhẹ, và cho CDR2 và CDR3 của miền biến đổi chuỗi nặng. Cũng được bao gồm là sơ đồ đánh số "Chothia", sơ đồ đánh số "ABM", sơ đồ đánh số "tiếp xúc" (xem tài liệu Martin, ACR. *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*[J]. 2001), sơ đồ đánh số ImMunoGenTics(IMGt) (Lefranc M.P., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55–77(2003)), và sơ đồ tương tự.

Thuật ngữ "khung kháng thể" được dùng để chỉ một phần của miền biến đổi VL hoặc VH, mà có chức năng như là khung cho các vòng gắn kết kháng nguyên (CDR) của miền biến đổi. Về cơ bản nó là miền biến đổi mà không có các CDR.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "quyết định kháng nguyên" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn vào. Epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liền kề hoặc không liền kề trong một cấu hình không gian duy nhất, ví dụ xem tài liệu, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E.Morris, Ed. (1996).

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu", "gắn kết chọn lọc", "gắn kết chọn lọc với" và "gắn kết đặc hiệu với" được dùng để chỉ việc gắn kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên tiền định. Nói chung, kháng thể gắn kết với ái lực (KD) nhỏ hơn 10^{-7} M, ví dụ nhỏ hơn 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn.

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

Thuật ngữ "cạnh tranh", nếu được sử dụng trong trường hợp mà các protein gắn kết với kháng nguyên (ví dụ, protein gắn kết với kháng nguyên trung hòa hoặc kháng thể trung hòa) cạnh tranh với cùng một epitop, được dùng để chỉ sự cạnh tranh giữa các protein gắn kết kháng nguyên được thử nghiệm bằng thử nghiệm sau trong đó protein gắn kết kháng nguyên cần thử nghiệm (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn có chức năng miễn dịch của nó) ngăn ngừa hoặc ức chế (ví dụ, làm giảm) sự gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên tham khảo (ví dụ, phôi tử hoặc kháng thể tham khảo) với kháng nguyên thông thường (ví dụ, kháng nguyên CEA hoặc đoạn của nó). Có nhiều loại thử nghiệm gắn kết cạnh tranh để xác định liệu protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh với loại khác hay không, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ trực tiếp hoặc gián tiếp trên pha rắn (radioimmunoassay-RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym trực tiếp hoặc gián tiếp trên pha rắn (enzyme immunoassay-EIA) và thử nghiệm bánh kẹp cạnh tranh (ví dụ xem tài liệu, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253), EIA biotin-avidin trực tiếp trên pha rắn (ví dụ, xem tài liệu, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), thử nghiệm đánh dấu trực tiếp trên pha rắn và thử nghiệm bánh kẹp đánh dấu trực tiếp trên pha rắn (xem tài liệu, ví dụ, Harlow và Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press),

RIA đánh dấu trực tiếp trên pha rắn với phân tử đánh dấu I-125 (xem tài liệu, ví dụ, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15), EIA biotin-avidin trực tiếp trên pha rắn (ví dụ, xem tài liệu, Cheung, et al, 1990, *Virology* 176:546-552) và RIA đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer et al, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Nói chung, thử nghiệm này đề cập đến việc sử dụng kháng nguyên đã tinh chế gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào mang protein gắn kết kháng nguyên thử nghiệm không được đánh dấu bất kỳ và protein gắn kết kháng nguyên tham khảo được đánh dấu. Ước chế cạnh tranh được đo bằng cách đo lượng phân tử đánh dấu gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào khi có mặt protein gắn kết kháng nguyên thử nghiệm. Nói chung, protein gắn kết kháng nguyên thử nghiệm có mặt với lượng dư. Protein gắn kết kháng nguyên được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh (protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh) bao gồm: protein gắn kết kháng nguyên gắn kết với cùng một epitop giống như protein gắn kết tham khảo, và protein gắn kết kháng nguyên gắn kết với epitop liền kề đủ gần với epitop gắn kết của protein gắn kết kháng nguyên tham khảo, và hai epitop gây cản trở không gian với nhau để ngăn ngừa sự gắn kết. Thông tin chi tiết thêm về phương pháp thử nghiệm gắn kết cạnh tranh được đề xuất trong các ví dụ ở đây. Nói chung, khi protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh có mặt với lượng dư, thì sự gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên tham khảo với kháng nguyên thông thường sẽ bị ức chế (như bị giảm) ít nhất là lớn hơn hoặc bằng 40–45%, 45–50%, 50–55%, 55–60%, 60–65%, 65–70%, 70–75% hoặc 75%. Trong một vài trường hợp, sự gắn kết này bị ức chế ít nhất 80–85%, 85–90%, 90–95%, 95–97%, hoặc 97% hoặc thậm chí là lớn hơn.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" được dùng để chỉ phân tử ADN hoặc phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là mạch đơn hoặc mạch kép, song tốt hơn nên là ADN mạch kép. Axit nucleic "được liên kết hoạt động" khi nó được đặt vào mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó tác động đến quá trình phiên mã của trình tự mã hóa.

"Tính đồng nhất" của trình tự axit amin được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin có chung giữa trình tự thứ nhất và trình tự thứ hai, trong đó khi sắp thẳng hàng các trình tự axit amin, các khoảng trống được đưa vào nếu cần để đạt được tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự tối đa, và bất kỳ sự thay thế bảo toàn nào cũng không được coi là một phần của tính đồng nhất trình tự. Đối với mục đích xác định tỷ

lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự axit amin, có thể tiến hành sắp thẳng hàng theo nhiều cách khác nhau mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có sẵn công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được các thông số thích hợp để đánh giá sự sắp thẳng hàng, kể cả các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp thẳng hàng tối đa của các trình tự sắp thẳng hàng có chiều dài đầy đủ.

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

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các đoạn gắn kết kháng nguyên là đã biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong chương 5–8 và 15 của tài liệu *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Các đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được mô tả trong sáng chế được thao tác di truyền để chứa một hoặc nhiều vùng FR khác của người trong vùng CDR không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể được lấy từ trang web <http://imgt.cines.fr> of ImMunoGeneTics (IMGT) hoặc từ tạp chí về globulin miễn dịch, Lefranc, G., *the Immunoglobulin FactsBook*, Academic Press, 2001 ISBN 012441351, bằng cách so sánh cơ sở dữ liệu gen dòng mầm của vùng biến đổi của kháng thể người IMGT bằng phần mềm MOE.

Thuật ngữ "tế bào chủ" được dùng để chỉ tế bào mà vector biểu hiện được đưa vào. Các tế bào chủ có thể bao gồm tế bào vi khuẩn, vi sinh vật, thực vật hoặc động vật. Vi khuẩn nhạy với sự biến nạp bao gồm các thành viên thuộc họ *Enterobacteriaceae*, như các chủng của *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; các thành viên của họ *Bacillaceae*, như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và

Haemophilus influenzae. Các vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Các dòng tế bào chủ thích hợp của động vật bao gồm CHO (dòng tế bào trứng chuột hamster Trung Quốc) và các tế bào NS0.

Kháng thể được thao tác di truyền hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tổng hợp và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được tách dòng và tái tổ hợp vào vectơ biểu hiện. Các vectơ biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào chủ. Theo giải pháp đã biết được khuyến cáo nhiều hơn, hệ biểu hiện của động vật có vú sẽ dẫn đến việc glycosyl hóa kháng thể, cụ thể là ở vị trí đầu N của vùng Fc. Các dòng dương tính được nhân rộng trong môi trường chứa trong bình phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy chứa kháng thể được tiết ra có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, ví dụ, sử dụng cột Sepharose FF A hoặc G. Các đoạn gắn kết không đặc hiệu được rửa trôi. Kháng thể gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng phương pháp gradien pH, và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thu gom. Kháng thể có thể được lọc và cô bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Các hỗn hợp hòa tan và các polyme cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, như rây phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được đông lạnh ngay, ví dụ, ở nhiệt độ -70°C , hoặc được đông khô.

Thuật ngữ "peptit" được dùng để chỉ phân đoạn hợp chất giữa axit amin và protein. Peptit được tạo thành bằng cách liên kết 2 hoặc nhiều phân tử axit amin bằng liên kết peptit, và là đoạn cấu trúc và chức năng của protein.

Thuật ngữ "đường" được dùng để chỉ đại phân tử sinh học gồm các nguyên tố C, H và O. Chúng có thể được phân loại thành monosacarit, disacarit, polysacarit và dạng tương tự.

Thuật ngữ "alkyl" được dùng để chỉ nhóm hydrocacbon béo bão hòa mà là nhóm mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, tốt hơn là alkyl có từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là alkyl có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, và tốt nhất là có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon (có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon). Các ví dụ không giới hạn bao gồm etyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *sec*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-dimetylpropyl, 1,2-dimetylpropyl, 2,2-dimetylpropyl, 1-etylpropyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, *n*-hexyl,

1-etyl-2-metylpropyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,1-dimetylbutyl, 1,2-dimetylbutyl, 2,2-dimetylbutyl, 1,3-dimetylbutyl, 2-etylbutyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 2,3-dimetylbutyl, *n*-heptyl, 2-metylhexyl, 3-metylhexyl, 4-metylhexyl, 5-metylhexyl, 2,3-dimetylpentyl, 2,4-dimetylpentyl, 2,2-dimetylpentyl, 3,3-dimetylpentyl, 2-etylpentyl, 3-etylpentyl, *n*-octyl, 2,3-dimetylhexyl, 2,4-dimetylhexyl, 2,5-dimetylhexyl, 2,2-dimetylhexyl, 3,3-dimetylhexyl, 4,4-dimetylhexyl, 2-etylhexyl, 3-etylhexyl, 4-etylhexyl, 2-etyl-2-etylpentyl, 2-etyl-3-etylpentyl, *n*-nonyl, 2-etyl-2-etylhexyl, 2-etyl-3-etylhexyl, 2,2-dietylpentyl, *n*-dexyl, 3,3-dietylhexyl, 2,2-dietylhexyl, và các chất đồng phân mạch bên khác nhau, và chất tương tự. Được ưu tiên hơn là alkyl thấp có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, và các ví dụ không giới hạn bao gồm etyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *sec*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-dimetylpropyl, 1,2-dimetylpropyl, 2,2-dimetylpropyl, 1-etylpropyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, *n*-hexyl, 1-etyl-2-metylpropyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,1-dimetylbutyl, 1,2-dimetylbutyl, 2,2-dimetylbutyl, 1,3-dimetylbutyl, 2-etylbutyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 2,3-dimetylbutyl và nhóm tương tự. Alkyl có thể được thế hoặc không được thế. Nếu được thế, nhóm thế có thể được thế ở vị trí nối có sẵn bất kỳ, trong đó tốt hơn là nhóm thế là một hoặc nhiều nhóm sau độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio, heteroxycloalkylthio và oxo.

Thuật ngữ "heteroalkyl" được dùng để chỉ alkyl chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó alkyl là như nêu trên.

Thuật ngữ "alkylen" được dùng để chỉ nhóm hydrocarbon béo mạch thẳng hoặc mạch nhánh bão hòa có 2 gốc thu được từ alkan gốc bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro từ cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác loại. Nhóm này là nhóm mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, tốt hơn là alkylen có từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là alkylen có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon (có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon). Các ví dụ không giới hạn về alkylen bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metylen(-CH₂-), 1,1-etyliden(-CH(CH₃)-), 1,2-etyliden(-CH₂CH₂-), 1,1-propyliden(-CH(CH₂CH₃)-), 1,2-propyliden(-CH₂CH(CH₃)-), 1,3-propyliden(-CH₂CH₂CH₂-),

1,4-butylden(-CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,5-butylden(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-) và nhóm tương tự. Alkylen có thể được thế hoặc không được thế. Nếu được thế, nhóm thế có thể được thế ở vị trí nối có sẵn bất kỳ bằng một hoặc nhiều nhóm thế tốt hơn là tùy ý độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio, heteroxycloalkylthio và oxo.

Thuật ngữ "alkoxy" được dùng để chỉ -O-(alkyl) và -O-(xycloalkyl được thế), trong đó alkyl hoặc xycloalkyl là như được nêu trên đây. Các ví dụ không giới hạn về alkoxy bao gồm: metoxy, etoxy, propoxy, butoxy, xyclopropyloxy, xyclobutoxy, xyclopentyloxy và xyclohexyloxy. Alkoxy có thể tùy ý được thế hoặc không được thế, và nếu được thế, tốt hơn là nhóm thế là một hoặc nhiều nhóm sau độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxycloalkyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio và heteroxycloalkylthio.

Thuật ngữ "haloalkyl" được dùng để chỉ nhóm alkyl trong đó hydro được thế bằng một hoặc nhiều halogen, trong đó alkyl là như được nêu trên.

Thuật ngữ "alkyl được đoteri hóa" được dùng để chỉ nhóm alkyl trong đó hydro được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử đoteri, trong đó alkyl là như được nêu trên đây.

Thuật ngữ "hydroxyalkyl" được dùng để chỉ nhóm alkyl trong đó hydro được thế bằng một hoặc nhiều nhóm hydroxy, trong đó alkyl là như được nêu trên.

Thuật ngữ "hydroxy" được dùng để chỉ nhóm -OH.

Thuật ngữ "halogen" được dùng để chỉ flo, clo, brom hoặc iot.

Thuật ngữ "amino" được dùng để chỉ -NH₂.

Thuật ngữ "nitro" được dùng để chỉ -NO₂.

Thuật ngữ "xyano" được dùng để chỉ -CN.

Sáng chế cũng đề cập đến các dạng được đoteri hóa khác nhau của hợp chất có công thức (I). Mỗi nguyên tử hydro có mặt được nối với nguyên tử cacbon có thể độc lập được thế bằng nguyên tử đoteri. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tổng hợp các hợp chất có công thức (I) ở dạng được đoteri hóa có dựa vào tài liệu tham khảo có liên quan. Các nguyên liệu ban đầu được đoteri hóa sẵn có

trên thị trường có thể được sử dụng để điều chế các dạng được đoteri hóa của hợp chất có công thức (I), hoặc chúng có thể được tổng hợp bằng các kỹ thuật thông thường với các tác nhân phản ứng được đoteri hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, boran được đoteri hóa, boran được tri-đoteri hóa trong tetrahydrofuran, lithi nhôm hydrua được đoteri hóa, iodoetan được đoteri hóa, iodometan được đoteri hóa, và tác nhân tương tự.

Thuật ngữ "tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả ngay sau đó có thể, nhưng không nhất thiết, xảy ra, và bản mô tả này bao gồm các trường hợp mà sự kiện hoặc tình huống này xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, "nhóm heteroxyclyl tùy ý được thế bằng alkyl" có nghĩa là alkyl có thể, nhưng không nhất thiết, có mặt, và bản mô tả này bao gồm trường hợp trong đó nhóm heteroxyclyl được thế hoặc không được thế bằng alkyl.

Thuật ngữ "được thế" có nghĩa là một hoặc nhiều, tốt hơn là tối đa là 5, tốt hơn nữa là 1, 2 hoặc 3 nguyên tử hydro trong nhóm độc lập được thế bằng nhóm thế. Nhóm thế chỉ có mặt ở vị trí hóa học có thể có của nó, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được (bằng thử nghiệm hoặc theo lý thuyết) có thể thế hoặc không thế thế mà không cần nỗ lực quá mức. Ví dụ, nhóm này có thể không ổn định khi amino hoặc hydroxy có hydro tự do được gắn kết với nguyên tử cacbon có liên kết không no (ví dụ, dạng olefin).

Thuật ngữ "được phẩm" được dùng để chỉ hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất được mô tả ở đây hoặc muối được dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc tiền được chất của nó, và các thành phần hóa học khác, ví dụ chất mang và tá được dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý. Mục đích của được phẩm này là để thúc đẩy hoạt động đối với sinh vật, mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu hoạt chất, nhờ đó đem lại hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ "muối được dụng" được dùng để chỉ muối của thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế, hoặc muối của hoạt chất được mô tả trong sáng chế. Các muối này là an toàn và có hiệu quả khi được sử dụng ở đối tượng và có hoạt tính sinh học cần thiết. Thể liên hợp phối tử được chất theo sáng chế ít nhất bao gồm một nhóm amino và do đó có thể tạo thành muối với axit. Các ví dụ không giới hạn về muối được dụng bao gồm: hydroclorua, hydrobromua, hydroiodat, sulfat, bisulfat, xitrat, axetat, succinat, ascorbat, oxalat, nitrat, sorbat, hydrophosphat, dihydrophosphat, salixylat,

hydroxitrat, tartrat, maleat, fumarat, format, benzoat, mesylat, etansulfonat, benzensulfonat và p-toluensulfonat.

Theo một phương án của sáng chế, dược chất gây độc tế bào được liên hợp với nhóm mercapto của kháng thể nhờ đơn vị liên kết.

Mức tải của thể liên hợp phối tử dược chất gây độc tế bào có thể được kiểm soát bằng các phương pháp không hạn chế sau, bao gồm:

- (1) kiểm soát tỷ lệ mol của tác nhân liên kết với kháng thể đơn dòng,
- (2) kiểm soát nhiệt độ và thời gian phản ứng, và
- (3) chọn các tác nhân phản ứng khác nhau.

Để bào chế dược phẩm thông thường xin tham khảo đến dược điển Trung Quốc.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" đối với dược chất theo sáng chế được dùng để chỉ hệ mà có thể làm thay đổi cách mà dược chất được đưa vào đối tượng và mức phân bố dược chất ở đối tượng, kiểm soát tốc độ giải phóng của dược chất, và phân phối dược chất đến cơ quan đích. Hệ hướng đích và giải phóng chất mang dược chất có thể làm giảm sự thoái biến dược chất và làm mất, làm giảm các tác dụng phụ và cải thiện độ sinh khả dụng. Ví dụ, chất hoạt động bề mặt polyme mà có thể được sử dụng làm chất mang có thể tự gắn do các cấu trúc lưỡng vùng duy nhất của chúng để tạo thành các dạng kết tụ khác nhau, như mixen, vi nhũ tương, gel, tinh thể lỏng và các nang, là các ví dụ được ưu tiên. Các dạng kết tụ có khả năng bao nang các phân tử dược chất và có tính thấm tốt đối với màng, và do đó có thể được sử dụng làm các chất mang dược chất cực tốt.

Thuật ngữ "tá dược" là phần bổ sung, ngoài hoạt chất, vào dược phẩm. Cũng có thể được dùng để chỉ chất bổ trợ. Ví dụ, chất kết dính, chất độn, chất gây rã, chất làm trơn trong viên nén; phần nền trong các chế phẩm kem và mỡ bán rắn; chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất làm nhẹ tác dụng phụ, chất tạo hương, đồng dung môi, chất nhũ hóa, chất hòa tan, chất điều chỉnh tính tương, chất tạo màu và chất tương tự trong các chế phẩm dạng lỏng đều có thể được gọi là tá dược.

Thuật ngữ "chất pha loãng", cũng được dùng để chỉ là chất độn, chủ yếu được sử dụng để làm tăng khối lượng và thể tích của viên nén. Việc bổ sung chất pha loãng không chỉ đảm bảo thể tích nhất định, mà còn làm giảm độ lệch liều của các thành phần chính, và cải thiện khả năng đúc nén của thuốc và ưu điểm tương tự. Nếu thuốc ở dạng viên nén chứa các thành phần chứa dầu, thì chất hấp thu cần được bổ sung vào để

hút các thành phần có dầu để duy trì trạng thái "khô" và do đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình bào chế viên nén. Ví dụ về chất hấp thu này bao gồm tinh bột, lactoza, các muối vô cơ của canxi, xenluloza vi tinh thể và dạng tương tự.

Dược phẩm có thể ở dạng dung dịch nước tiêm được vô trùng. Chất dẫn hoặc dung môi sẵn có và chấp nhận được bao gồm nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Chế phẩm tiêm được vô trùng có thể là vi nhũ tương dầu trong nước tiêm được vô trùng trong đó hoạt chất được hòa tan trong pha dầu. Ví dụ, hoạt chất được hòa tan trong hỗn hợp chứa dầu đậu nành và lexithin. Dung dịch chứa dầu sau đó được bổ sung vào hỗn hợp chứa nước và glyxerol và được xử lý để tạo thành vi nhũ tương. Dung dịch tiêm hoặc vi nhũ tương có thể được tiêm khu trú vào máu của đối tượng với lượng lớn. Theo cách khác, có thể mong muốn sử dụng dung dịch và vi nhũ tương theo cách sao cho duy trì được nồng độ của hợp chất theo sáng chế không đổi trong hệ tuần hoàn. Để duy trì nồng độ không đổi này, thiết bị phân phối qua đường tĩnh mạch liên tục có thể được sử dụng. Ví dụ về thiết bị như vậy là Deltec CADD-PLUS. Bơm tiêm tĩnh mạch TM. 5400.

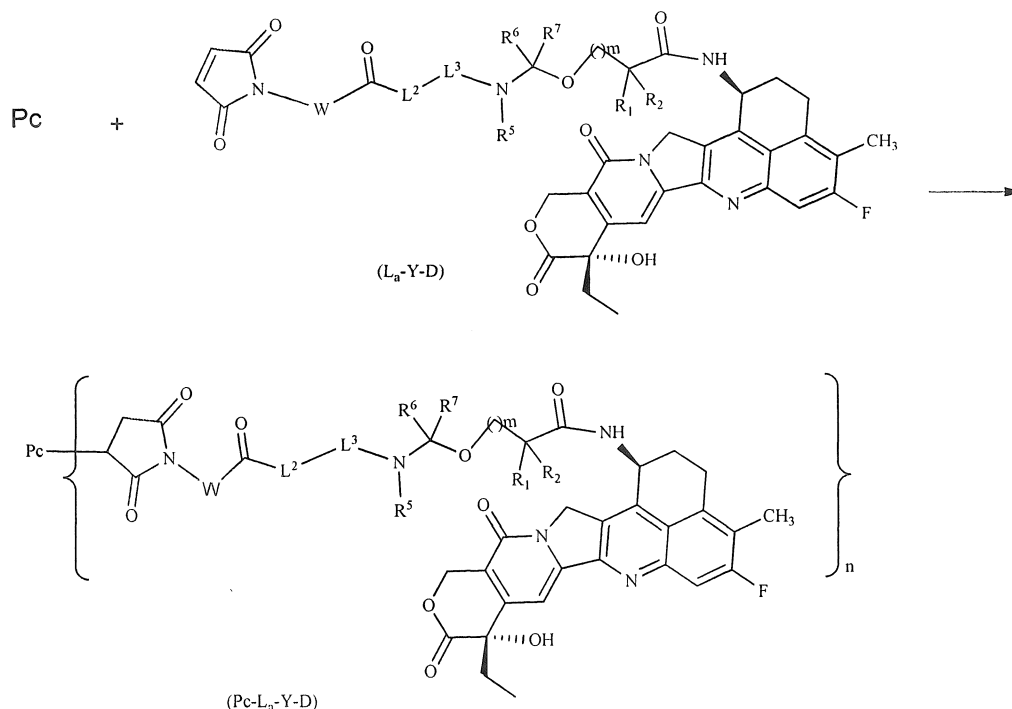
Dược phẩm có thể ở dạng hỗn dịch chứa nước hoặc dầu tiêm được vô trùng để sử dụng trong cơ và dưới da. Hỗn dịch có thể được bào chế theo giải pháp kỹ thuật đã biết bằng cách sử dụng các chất gây phân tán hoặc các chất làm ẩm và các chất tạo hỗn dịch thích hợp nêu trên. Chế phẩm tiêm được vô trùng cũng có thể là hỗn dịch hoặc dung dịch tiêm vô trùng được bào chế trong dung môi hoặc chất pha loãng không độc chấp nhận được ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dung dịch được bào chế trong 1,3-butanediol. Ngoài ra, dầu cố định vô trùng có thể thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường tạo hỗn dịch. Đối với mục đích này, dầu cố định hỗn hợp bất kỳ chứa các monoglyxerit hoặc diglyxerit tổng hợp có thể được sử dụng. Ngoài ra, axit béo như axit oleic cũng có thể được sử dụng để bào chế thuốc tiêm.

Sáng chế đề cập đến nhánh liên kết phân cắt được có cấu trúc cụ thể, hoạt chất có cấu trúc cụ thể, và thể liên hợp kháng thể dược chất (ADC) chứa nhánh liên kết, hoạt chất và kháng thể này. ADC như vậy là một phức hợp được tạo thành bằng cách liên kết chất gây độc với kháng thể thông qua phân tử đệm. Thể liên hợp kháng thể dược chất (ADC) được thoái biến *in vivo* để giải phóng phân tử có hoạt tính, nhờ đó đóng một vai trò quan trọng trong việc điều trị chống khối u.

2. Phương pháp tổng hợp

Đối với mục đích tổng hợp, các sơ đồ kỹ thuật để tổng hợp sau được sử dụng.

Phương pháp điều chế hợp chất có công thức chung (Pc-L_a-Y-D) bao gồm các bước sau:



Tiến hành phản ứng liên hợp Pc đã khử và hợp chất có công thức chung (L_a-Y-D) để thu được hợp chất công thức chung (Pc-L_a-Y-D), trong đó chất khử tốt hơn là TCEP; đặc biệt là, các liên kết disulfua trong kháng thể tốt hơn là được khử;

trong đó:

Pc, W, L², L³, R¹, R², R⁵-R⁷, m và n là như được nêu trong công thức chung (Pc-L_a-Y-D).

Một hoặc nhiều phương án theo sáng chế được mô tả chi tiết trong phần mô tả trên đây. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc giống với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, song các phương án và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây. Các đặc điểm, mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn dựa vào phần mô tả và yêu cầu bảo hộ. Trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, các dạng số ít bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được chỉ ra rõ ràng theo cách khác trong phần mô tả này. Trừ khi được quy định theo cách khác, toàn bộ các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế thuộc về. Toàn bộ các patent và các

công bố được viện dẫn trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ sau được đưa ra để minh họa các phương án được ưu tiên của sáng chế một cách đầy đủ hơn. Các ví dụ này không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chuẩn bị protein tái tổ hợp CEA và tế bào được chuyển nhiễm ổn định

I. Các trình tự của kháng nguyên CEA tái tổ hợp và protein CEA được biểu hiện trên bề mặt tế bào

Các trình tự axit amin của CEA của người có đuôi Fc và His được tách dòng trong các vectơ biểu hiện của tế bào động vật có vú, và thu protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện và tinh chế trong các tế bào 293E và sau đó được sử dụng trong các thử nghiệm trong các ví dụ sau. Trong khi đó, gen CEA của người không được đánh dấu, gen CEACAM1 của người và gen CEA của khỉ được chuyển nhiễm vào tế bào CHO để tạo thành chủng tế bào CHO biểu hiện protein CEA trên các bề mặt tế bào để sàng lọc sau đó và xác định các kháng thể. Các trình tự axit amin của các protein có liên quan là như sau:

1. Trình tự axit amin của CEA người-His (hCEA-His):

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLQPQLFGYSWKGERVDGNRQIIIGYVI
GTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRV
YPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSRLQLS
NGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTS
YRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFWNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQA
HNSDTGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLW
WWNNQSLPVSRLQLSNDNRTLTLVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVIL
NVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELF
ISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDA
VAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYV
CGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQY
SWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTS
PGLSAHHHHHH

(SEQ ID NO: 1)

2. Trình tự axit amin của CEA người-Fc (hCEA-Fc):

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNL PQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVI
 GTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNNDTG FYTLHVIKSDLVNEEATGQFRV
 YPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLS
 NGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTS
 YRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQA
 HNSDTGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLW
 WVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTL SVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVIL
 NVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNL SLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELF
 ISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDA
 VAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYV
 CGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQY
 SWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTS
 PGLSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN
 HTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2)

3. Trình tự axit amin của CEA khỉ cynomolgus-His (cynoCEA-His):

QLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQNLF GYIWKGERVDASRRIGSCVI
 RTQQITPGPAHSGRETIDFNASLLIQNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFR
 VYPELPKPYITSNNSNPIEDKDAVALTCEPETQD TTYLWWVNNQSLPVSPRLEL
 SSDNRTLTVFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRRSDPVT LNVLYGPDAPTISPLNTP
 YRAGEYLNLTCHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQA
 HNSATGLNRTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQD TTYLW
 WVNNQRLSVSSRLELSNDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRRSDPVT L
 NVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPA AQYFWFVNGTFQQSTQEL
 FIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPIEDKD
 AVTLTCEPVAENTTYLWWVNNQSLSVSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTG PYE
 CGIQNSESAKRSDPVT LNVTYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLSCHSDSNPSQY
 SWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNNGAYACFVS NLATGRNNSIVKNISVSSGDSA

PGSSGLSAHHHHHH

(SEQ ID NO: 3)

4. Trình tự axit amin của CEA người được biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO (hCEA-CHO):

MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKE
VLLLVHNLPQHFLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPN
ASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDK
DAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASY
KCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPA
QYSWVFNNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAE
PPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDN
RTLTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPG
VNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSAS
GHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNG
QSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLY
GPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITP
NNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

(SEQ ID NO: 4)

5. Trình tự axit amin của CEA khỉ biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO (cynoCEA-CHO):

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQNLFG
YIWKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETIDFNASLLIQNVTQSDTGS
YTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYITSNNSNPEDKDAVALTCEPETQDT
TYLWWVNNQSLPVSPRLELSSDNRTLTVFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRRSD
PVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGEYLNLTCHAASNPTAQYFWFNNGTFQQS
TQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYAEKPKPYITSNNSNP
EDKDAVTLTCEPETQDTTYLWWVNNQRLSVSSRLELSNDNRTLTVFNIPRNDT
TFYECETQNPVSVRRSDPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASN
PAAQYFWFNNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITV
YVELPKPYISSNNSNPEDKDAVTLTCEPVAENTTYLWWVNNQSLSVSPRLQLS
NGNRILTLLSVTRNDTGPYECGIQNSESAKRSDPVTNLNVTYGPDTPHSPDLSY
RSGANLNLSCHSDSNPSQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNNGAYACFVSN

LATGRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSARATVGIIIGMLVGVALM

(SEQ ID NO: 5)

6. Trình tự axit amin của CEACAM1 người được biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO (CEACAM1-CHO):

MGHLSAPLHRVRVPWQGALLTASLLTFWNPPTTAQLTTESMPFNVAEGK
EVLLLVHNLPPQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIY
PNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPV
EDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQLPVSRLQLSNGNRTLTLSSVTRNDT
GPYECEIQNPVSANRSDPVTNLNVTYGPDTPTISPSDTYYRPGANLSLSCYAASN
PPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYCHANNSVTGCNRTTVKTIIVT
ELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMK
LSQGNTTSLINPVKREDAGTYWCEVFNPISKNQSDPIMLVNLYNALPQENGLS
PGAIAIGIVIGVVALVALIAVALACFLHFGKTGRASDQRDLTEHKPSVSNHTQDH
SNDPPNKMNEVTYSTLNFEAQQPTQPTSASPSLTATEIIYSEVKKQ

(SEQ ID NO: 6)

II. Tinh chế các protein có liên quan

1. Tinh chế protein có đuôi His

Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tạp chất. Cột niken được làm cân bằng bằng dung dịch đệm PBS (pH 7,4) và được rửa bằng 2–5 thể tích cột, và mẫu dịch nổi được đưa vào cột Ni Sepharose chiếm ưu thế ở tốc độ dòng. Cột được rửa bằng dung dịch đệm PBS cho đến khi chỉ số đọc A_{280} giảm đến mức cơ sở. Sau đó, cột sắc ký được rửa bằng PBS + imidazol 10 mM để loại bỏ các protein tạp chất không gắn kết đặc hiệu, và thu gom dịch lỏng chảy ra. Cuối cùng, protein đích được rửa giải bằng dung dịch PBS chứa imidazol 300 mM, và đỉnh rửa giải được thu gom. Nước giải hấp thu gom được cô, và dung dịch đậm mẫu được thay đổi thành dung dịch PBS bằng cách loại muối trong cột để thu được hỗn hợp để dùng trong các thử nghiệm tiếp theo.

2. Tinh chế protein chứa Fc, kháng thể khảm và kháng thể từ tế bào lai

Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ các tạp chất, protein tái tổ hợp chứa Fc và dịch nổi biểu hiện kháng thể khảm được tinh chế bằng cách sử dụng cột Protein A, và dịch nổi biểu hiện tế bào lai được tinh chế bằng cách sử dụng cột Protein G. Dịch nổi được đưa vào cột ở tốc độ dòng. Cột được rửa bằng PBS

cho đến khi chỉ số đọc A_{280} giảm đến mức cơ sở. Protein đích được rửa giải bằng axit axetic 100 mM ở độ pH 3,0 và được trung hòa bằng Tris-HCl 1M ở độ pH 8,0. Mẫu rửa giải được cô, và dung dịch đậm mẫu được thay đổi thành PBS để thu được hỗn hợp, mà được chia nhỏ để sử dụng sau đó.

Ví dụ 2: Chuẩn bị kháng thể đơn dòng CEA của chuột kháng người

1. Gây miễn dịch và dung hợp

Chuột được gây miễn dịch bằng protein hCEA-His và protein cyno-CEA-His, hoặc được gây miễn dịch chéo bằng các tế bào hCEA-CHO và các tế bào cynoCEA-CHO. Lượng protein gây miễn dịch là 50 μ g đối với gây miễn dịch lần đầu và 25 μ g đối với các lần gây miễn dịch tiếp theo, mức gây miễn dịch bằng tế bào là 10^7 tế bào mỗi lần gây miễn dịch, và gây miễn dịch được tiến hành mỗi hai tuần một lần. Sau 3 lần gây miễn dịch, máu được lấy ra để xác định hiệu lực của kháng thể trong huyết thanh. Chuột mà có hiệu giá kháng thể trong huyết thanh cao và đang đạt đến trạng thái ổn định được chọn để dung hợp tế bào lách. Các tế bào lympho lách và tế bào u tủy, tế bào Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™), được dung hợp bằng quy trình dung hợp qua trung gian PEG để tạo ra được các tế bào lai. Các tế bào lai đã dung hợp được tái huyền phù trong môi trường bán rắn đầy đủ MC (môi trường RPMI-1640 chứa 20% FBS, $1 \times$ HAT, $1 \times$ OPI và 2% etyl xenluloza) ở mật độ $0,5-1 \times 10^6$ tế bào/mL, và huyền phù được chia nhỏ vào các đĩa nuôi cấy tế bào có đường kính 35 mm và ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2 trong 7-9 ngày. Vào ngày 7-9 sau khi dung hợp, theo kích cỡ dòng tế bào, các dòng tế bào đơn được lấy vào đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ mà đã được bổ sung 200 μL /lỗ môi trường đầy đủ HT (môi trường RPMI-1640 chứa 20% FBS, $1 \times$ HT và $1 \times$ OPI), nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2 trong 3 ngày, và sau đó được phát hiện.

2. Sàng lọc các tế bào lai

Việc sàng lọc sơ bộ các kháng thể được tiến hành dựa trên thử nghiệm hấp thụ miễn dịch có liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) các kháng nguyên trên bề mặt tế bào. Các tế bào được phết lên đĩa Elisa (Corning, Cat # 3599) và được nuôi cấy qua đêm trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C . Khi các tế bào bám hoàn toàn vào thành và lấp gần hết toàn bộ lỗ, dịch nổi được lấy ra. Các tế bào được rửa một lần bằng PBS, và sau đó được cố định bằng dung dịch đệm cố định tế bào (Beyotime, Cat # P0098) ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Dung dịch đệm cố định được loại bỏ, và đĩa

được rửa ba lần bằng nước rửa đĩa, và phong bế bằng 5% bột sữa gầy ở nhiệt độ 37°C trong hơn 3 giờ. Dung dịch phong bế được loại bỏ, và đĩa được rửa ba lần bằng cách sử dụng nước rửa đĩa. Đĩa chứa tế bào đã phong bế được bảo quản ở nhiệt độ -20°C hoặc được sử dụng trực tiếp. Khi đĩa được sử dụng, dịch nuôi cấy tế bào lai đã pha loãng gradien được bổ sung, và đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ và rửa ba lần bằng nước rửa đĩa. 100 µL kháng thể thứ cấp dê kháng chuột IgG H&L (HRP) đã pha loãng 10.000 lần (Abcam, Cat # ab205719) được bổ sung, và đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ và rửa 3 lần bằng nước rửa đĩa. 100 µL TMB (KPL, Cat # 5120-0077) được bổ sung, và đĩa được đặt ở nhiệt độ 37°C để hiện màu trong 10 phút. Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 100 µL axit sulfuric 1M, và mức hấp thụ được đọc ở bước sóng 450 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa. Khi kháng thể thử nghiệm được gắn kết với CEA trên bề mặt tế bào mà không bị gắn kết cạnh tranh bởi CEA hòa tan (sCEA), kháng thể được ủ với sCEA trong 30 phút và sau đó được bổ sung vào đĩa tế bào.

Các dòng dương tính đã sàng lọc được nhân rộng, đông lạnh để bảo quản giống và tách dòng phụ hai đến ba lần cho đến khi thu được các dòng tế bào đơn. Các dòng tế bào lai đã sàng lọc còn được chuẩn bị và tinh chế bằng cách nuôi cấy tế bào không cần huyết thanh. Việc gắn kết kháng thể từ tế bào lai thu được với protein CEA trên bề mặt tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào dòng chảy (phương pháp này được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 1 của sáng chế), và các chủng tế bào lai có hoạt tính gắn kết tốt được chọn lọc. Các kết quả phát hiện của hoạt tính gắn kết của các chủng tế bào lai đơn dòng mAb47, mAb63, mAb67 và mAb103 được thể hiện trong bảng 1:

Bảng 1. Các kết quả của thử nghiệm gắn kết của các kháng thể chuột với các protein CEA trên bề mặt tế bào

Các kháng thể	EC50 (nM)		
	MKN45	cynoCEA-CHO	CEACAM1-CHO
mAb47	2,10	1,66	Không gắn kết
mAb63	3,62	2,88	Không gắn kết
mAb67	1,90	6,00	Không gắn kết
mAb103	3,94	0,71	Không gắn kết

3. Giải trình tự các kháng thể từ tế bào lai

Các chủng tế bào lai đơn dòng mAb47, mAb63, mAb67 và mAb103 được chọn, và các trình tự của kháng thể đơn dòng được tách dòng. Quy trình tách dòng là như sau: tế bào lai phát triển ở pha log được thu gom, và ARN được chiết bằng Trizol (Invitrogen, Cat #15596-018) và được phiên mã ngược thành cADN. Sau khi khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng cADN làm khuôn mẫu, cADN được giải trình tự nhờ công ty giải trình tự, và các trình tự axit amin của kháng thể tương ứng với các trình tự ADN thu được được thể hiện trong bảng 2 dưới đây:

Bảng 2. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể chuột kháng CEA

Các kháng thể	Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH	Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL
mAb47	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKW MGWINTYSGVPTYADDFKGRFAF SLETSASTAYLQINNLIKNEEDTATYF CARRGNYGRWDFDVWGTGTTVT VSS (SEQ ID NO: 7)	EIVLTQSPALMAASPGEKVTIT CSVSSTISSNLHWYQQKSETS PKPWIYGTSNLASGVVPVRFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCQQWSIYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 8)
mAb63	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCK ASGYTFTDFYMNWVRQSHGKSLE WIGDIFPKNGNTDYNRKFKDKATL TVDKSSNTVYMEFRSLTLEDSAIY FCARSGYGNVFDYWGQGTFITV SS (SEQ ID NO: 9)	DVQMTQTPSALSASLGDRVTI SCRSTSQDINIYLNWYQQKPDG TVKLLIYYRSGLLSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEPEDIATYF CQQGNTLPPTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)
mAb67	EVQLQQSGPELVKPGASVKIYCKA SGYTFTDYHMNVWVKQSHGKSLE WIGDINPDIGGTSYNQNFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCSRWDFDSFANWGQGTLLVTVSA (SEQ ID NO: 11)	DIVMTQSPASLAMS LGKRATIS CRASESVSIIGTNLIHWYQQKP GQPPKLLIYHASNLETGVPARF SGSGSGADFTLTIDPVEGDDV ALYYCLQSRKIPYTFGGGTKM EIK (SEQ ID NO: 12)
mAb103	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTTYGVIWVKQAPGKGLKW	DLVVTQSSSASFSLGASAKLTC TLSSQHSTYTIEWYQQQPLKP

MGWINTYSGVPTYADDFKGRFAF SLETSASTAFLQINNLIKNETATYF CARKKTLTTVTPWFAYWGQGLV TVSA (SEQ ID NO: 13)	PKYVMELKKDGSHTGDGIPD RFGSSSGADRYLTISNIQPEDE AIYICGVGNTIKEQFVYVFGG GTKVTVL (SEQ ID NO: 14)
---	---

Bảng 3. Các trình tự CDR của các kháng thể kháng CEA

Các kháng thể	Trình tự CDR chuỗi nặng		Trình tự CDR chuỗi nhẹ	
mAb47	HCDR1	TYGMS (SEQ ID NO: 15)	LCDR1	SVSSTISSSNLH (SEQ ID NO: 18)
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16)	LCDR2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 19)
	HCDR3	RGNYGRWDFDV (SEQ ID NO: 17)	LCDR3	QQWSIYPLT (SEQ ID NO: 20)
mAb63	HCDR1	DFYMN (SEQ ID NO: 21)	LCDR1	RTSQDINIYLN (SEQ ID NO: 24)
	HCDR2	DIFPKNGNTDYNRKFKD (SEQ ID NO: 22)	LCDR2	YRSGLLS (SEQ ID NO: 25)
	HCDR3	SGYGNYVFDY (SEQ ID NO: 23)	LCDR3	QQGNTLPPT (SEQ ID NO: 26)
mAb67	HCDR1	DYHMN (SEQ ID NO: 27)	LCDR1	RASESVSIIGTNLIH (SEQ ID NO: 30)
	HCDR2	DINPDIGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO: 28)	LCDR2	HASNLET (SEQ ID NO: 31)
	HCDR3	WDFDSFAN (SEQ ID NO: 29)	LCDR3	LQSRKIPYT (SEQ ID NO: 32)
mAb103	HCDR1	TYGVI (SEQ ID NO: 33)	LCDR1	TLSSQHSTYTIE (SEQ ID NO: 35)
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16)	LCDR2	LKKDGSHTGD (SEQ ID NO: 36)
	HCDR3	KKTLTTVTPWFAY (SEQ ID NO: 34)	LCDR3	GVGNTIKEQFVYV (SEQ ID NO: 37)

Lưu ý: các trình tự CDR của kháng thể trong bảng được xác định theo hệ đánh số Kabat.

4. Điều chế kháng thể khảm IgG1 của người

Các trình tự gen mã hóa vùng biến đổi được tạo ra bằng cách khuếch đại và giải trình tự các phân tử dự tuyển mAb47, mAb63, mAb67 và mAb103 được tạo ra bằng cách sàng lọc tế bào lai, đoạn mỗi đầu-đuôi được thiết kế bằng cách sử dụng các trình tự thu được bằng cách giải trình tự, các đoạn gen VH/VK được tạo ra cho mỗi kháng thể bằng PCR sử dụng gen đã giải trình tự làm khuôn mẫu, và được tái tổ hợp tương đồng với vector biểu hiện pHr (có peptit tín hiệu và đoạn gen (CH1-Fc/CL) vùng ổn định hIgG1/hkappa/hlambda) để tạo thành plasmid có chiều dài đầy đủ biểu hiện kháng thể khảm tái tổ hợp VH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHr, và để tạo ra các kháng thể khảm Ch47, Ch63, Ch67 và Ch103.

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

Bằng cách so sánh cơ sở dữ liệu gen dòng mầm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể người IMGT và phần mềm MOE, các gen dòng mầm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng với độ tương đồng cao được chọn làm khuôn mẫu, và các CDR của kháng thể chuột được ghép thành các khuôn mẫu tương ứng được làm tương thích với người để tạo thành các trình tự vùng biến đổi theo trình tự FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Các gốc axit amin của CDR của các kháng thể trong các ví dụ sau được xác định và chú thích bằng hệ đánh số Kabat.

1. Làm tương thích với người kháng thể chuột mAb47

Các gen dòng mầm của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng có tính tương đồng cao được chọn làm khuôn mẫu; ví dụ, đối với kháng thể chuột mAb47, IGKV6-21*01 và IGKJ2*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nhẹ được làm tương thích với người, và IGHV7-4-1*02 và IGHJ6*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nặng được làm tương thích với người. Các CDR của kháng thể chuột mAb47 được ghép thành các khuôn mẫu được làm tương thích với người tương ứng để làm tương thích với người, và việc thiết kế các đột biến ngược được làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb47 được thể hiện trong bảng 4 dưới đây:

Bảng 4. Thiết kế việc làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb47

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người của mAb47	Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người của mAb47
--	---

h47VL1	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) được ghép	h47VH1	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) được ghép
h47VL2	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) được ghép+L46P, K49Y, F71Y	h47VH2	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) được ghép+E46K
h47VL3	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) được ghép+L46P, L47W, K49Y, F71Y	h47VH3	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) được ghép+R38K, E46K
h47VL4	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) được ghép+L46P, L47W, K49Y, D70S, F71Y	h47VH4	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) được ghép+R38K, E46K

Lưu ý: vị trí axit amin trong bảng này được đánh số theo hệ đánh số Kabat; ví dụ, L46P có nghĩa là L ở vị trí 46 được đột biến ngược thành P theo hệ đánh số Kabat; được ghép có nghĩa là các CDR kháng thể chuột được ghép vào các trình tự vùng FR dòng mầm của người.

Ngoài ra, đột biến D61S còn được đưa vào vùng biến đổi chuỗi nặng h47VH3 (ví dụ, đưa đột biến axit amin vào HCDR2 kháng thể để trình tự của HCDR2 kháng thể được thay đổi từ WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16) thành WINTYSGVPTYASDFKG (SEQ ID NO: 38)) để tạo ra vùng biến đổi chuỗi nặng h47VH4, với hoạt tính tốt của kháng thể được giữ lại.

Các trình tự đặc hiệu của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb47 được thể hiện trong bảng 5:

Bảng 5. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb47

Vùng biến đổi số	Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể được làm tương thích với người mAb47
h47VH1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGMSWVRQAPGQG LEWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCARRGNYGRWDFDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 39)
h47VH2	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGMSWVRQAPGQG LKW W MGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCARRGNYGRWDFDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 40)
h47VH3	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGMSWV K QAPGQG LKW W MGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCARRGNYGRWDFDVWGQGTITVTVSS

	(SEQ ID NO: 41)
h47VH4	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMSWVKKQAPGQG LKW MG WINTYSGVPTYASDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCARRGNYGRWDFDVWGQGT TV TVSS (SEQ ID NO: 42)
h47VL1	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSVSSTISSSNLHWYQQKPDQSPKL LIK G TSN LA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQWSI YPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 43)
h47VL2	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSVSSTISSSNLHWYQQKPDQSPK P LI Y G TSN LA SGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSI YPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)
h47VL3	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSVSSTISSSNLHWYQQKPDQSPK P W I Y G TSN LA SGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWS IYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 45)
h47VL4	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSVSSTISSSNLHWYQQKPDQSPK P W I Y G TSN LA SGVPSRFSGSGSGT S YTLTINSLEAEDAATYYCQQWSI YPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 46)

Lưu ý: các vùng CDR (được xác định bởi hệ đánh số Kabat) được gạch chân trong bảng, và các vị trí đột biến được in nghiêng đậm.

2. Làm tương thích với người kháng thể chuột mAb63

Các gen dòng mầm của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng có tính tương đồng cao được chọn làm khuôn mẫu; ví dụ, đối với kháng thể chuột mAb63, IGKV1-39*01 và IGKJ4*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nhẹ được làm tương thích với người, và IGHV1-46*01 và IGHJ1*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nặng được làm tương thích với người. Các CDR của kháng thể chuột mAb63 được ghép vào các khuôn mẫu được làm tương thích với người tương ứng để làm tương thích với người, và thiết kế đột biến ngược được làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb63 được thể hiện trong bảng 6 dưới đây:

Bảng 6. Thiết kế làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb63

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người mAb63		Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb63	
h63VL1	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) được ghép	h63VH1	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) được ghép
h63VL2	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) được ghép +I2V, F71Y	h63VH2	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) được ghép+M69L, R71V, T73K

h63VL3	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) được ghép+I2V, K42G, P44V, F71Y	h63VH 3	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) được ghép+M48I, V67A, M69L, R71V, T73K, L82F
		h63VH 4	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) được ghép+M48I, R66K, V67A, M69L, R71V, T73K, L82F, S <u>82A</u> R

Lưu ý: vị trí axit amin trong bảng này được đánh số theo hệ đánh số Kabat; ví dụ, S82AR có nghĩa là S ở vị trí 82A được đột biến ngược thành R theo hệ đánh số Kabat; được ghép có nghĩa là các CDR kháng thể chuột được ghép vào các trình tự vùng FR dòng mầm của người.

Ngoài ra, đột biến N54S còn được đưa vào vùng biến đổi chuỗi nặng h63VH1 (tức là, đưa đột biến axit amin vào HCDR2 kháng thể để trình tự của HCDR2 kháng thể được thay đổi từ DIFPKNGNTDYNRKFKD (SEQ ID NO: 22) thành DIFPKSGNTDYNRKFKD (SEQ ID NO: 47)) để tạo ra vùng biến đổi chuỗi nặng h63VH5, với hoạt tính tốt của kháng thể được giữ lại.

Các trình tự đặc hiệu của kháng thể chuột được làm tương thích với người và được gây đột biến mAb63 được thể hiện trong bảng 7:

Bảng 7. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb63

Vùng biến đổi số	Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể được làm tương thích với người mAb63
h63VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW MGD <u>DIFPKNGNTDYNRKFKD</u> RVMTMTRDTSTSTVYMESSLRSED T AVYYC AR <u>SGYGN</u> YVFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 48)
h63VH2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW MGD <u>DIFPKNGNTDYNRKFKD</u> RVTLTVDKSTSTVYMESSLRSED T AVYYCA RSGYGN Y VFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 49)
h63VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW GD <u>DIFPKNGNTDYNRKFKD</u> RA T LTVDKSTSTVYME F SSLRSED T AVYYCAR SGYGN Y VFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 50)
h63VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW GD <u>DIFPKNGNTDYNRKFKD</u> KATLTVDKSTSTVYME F RSLRSED T AVYYCAR SGYGN Y VFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 51)
h63VH5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW MGD <u>DIFPKSGNTDYNRKFKD</u> RVMTMTRDTSTSTVYMESSLRSED T AVYYCA

	<u>RSYGNYVFDYWGQGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 52)
h63VL1	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSODINIYLNWYQQKPGKAPKLLIYYR</u> <u>SGLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGGGTK</u> VEIK (SEQ ID NO: 53)
h63VL2	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSODINIYLNWYQQKPGKAPKLLIYYR</u> <u>SGLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGGGTK</u> VEIK (SEQ ID NO: 54)
h63VL3	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSODINIYLNWYQQKPGGAVKLLIYY</u> <u>RSGLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGGGT</u> KVEIK (SEQ ID NO: 55)

Lưu ý: các vùng CDR (được xác định bởi hệ đánh số Kabat) được gạch chân trong bảng, và các vị trí đột biến được in nghiêng đậm.

3. Làm tương thích với người kháng thể chuột mAb67

Các gen dòng mầm của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có tính tương đồng cao được chọn làm khuôn mẫu; ví dụ, đối với kháng thể chuột mAb67, IGKV4-1*01 và IGKJ4*01, IGKV3-15*01 và IGKJ4*01, hoặc IGKV1-39*01 và IGKJ4*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nhẹ được làm tương thích với người, và IGHV1-3*01 và IGHJ1*01, hoặc IGHV5-51*01 và IGHJ1*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nặng được làm tương thích với người. Các CDR của kháng thể chuột mAb67 được ghép vào các khuôn mẫu được làm tương thích với người tương ứng để làm tương thích với người, và thiết kế đột biến ngược được làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb67 được thể hiện trong bảng 8 dưới đây:

Bảng 8. Thiết kế làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb67

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người mAb67		Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb67	
h67VL1	(IGKV4-1*01+IGKJ4*01) được ghép	h67VH1	(IGHV1-3*01+IGHJ1*01) được ghép
h67VL2	(IGKV3-15*01+IGKJ4*01) được ghép	h67VH2	(IGHV5-51*01+IGHJ1*01) được ghép
h67VL3	(IGKV3-15*01+ IGKJ4*01) được ghép+A43P, I58V	h67VH3	(IGHV5-51*01+IGHJ1*01) được ghép+R38K, Q66K, A71V
h67VL4	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01)		

	được ghép		
h67VL5	(IGKV1-39*01+ IGKJ4*01) được ghép+Q3V, A43P		

Lưu ý: các vị trí axit amin trong bảng được đánh số nhờ hệ đánh số Kabat; ví dụ, A43P có nghĩa là A ở vị trí 43 được đột biến ngược thành P theo hệ đánh số Kabat; được ghép có nghĩa là các CDR kháng thể chuột được ghép vào các trình tự vùng FR dòng mầm của người.

Các trình tự đặc hiệu của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb67 được thể hiện trong bảng 9:

Bảng 9. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb67

Vùng biến đổi số	Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể được làm tương thích với người mAb67
h67VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD <u>YHMN</u> WVRQAPGQ RLEWMGDINPDIGGTSYNQNFKGGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCAR <u>WDFDSFAN</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 56)
h67VH2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTD <u>YHMN</u> WVRQMPGKG LEWMGDINPDIGGTSYNQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCAR <u>WDFDSFAN</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 57)
h67VH3	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTD <u>YHMN</u> WV <u>K</u> QMPGKG LEWMGDINPDIGGTSYNQNFKG <u>K</u> VTISVDKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCAR <u>WDFDSFAN</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 58)
h67VL1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQP PKLLIY <u>HASNLET</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>LQ</u> <u>SRKIPYTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO: 59)
h67VL2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQA PRLLIY <u>HASNLET</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <u>LQS</u> <u>RKIPYTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO: 60)
h67VL3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQP PRLLIY <u>HASNLET</u> GVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <u>LQS</u> <u>RKIPYTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO: 61)
h67VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGKA PKLLIY <u>HASNLET</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>LQS</u> <u>RKIPYTFGGG</u> TKVEIK (SEQ ID NO: 62)
h67VL5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGK <u>P</u> PKLLIY <u>HASNLET</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>LQS</u> <u>RKIPYTFGGG</u> TKVEIK

	(SEQ ID NO: 63)
--	-----------------

Lưu ý: các vùng CDR (được xác định bởi hệ đánh số Kabat) được gạch chân trong bảng, và các vị trí đột biến được in nghiêng đậm.

4. Làm tương thích với người kháng thể chuột mAb103

Các gen dòng mầm của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng có tính tương đồng cao được chọn làm khuôn mẫu; ví dụ, đối với kháng thể chuột mAb103, IGLV4-69*01 và IGLJ2*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nhẹ được làm tương thích với người, và IGHV7-4-1*02 và IGHJ1*01 được chọn làm các khuôn mẫu chuỗi nặng được làm tương thích với người. Các CDR của kháng thể chuột mAb103 được ghép vào các khuôn mẫu được làm tương thích với người tương ứng để làm tương thích với người, và thiết kế đột biến ngược được làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb103 được thể hiện trong bảng 10 dưới đây:

Bảng 10: Thiết kế làm tương thích với người cho kháng thể chuột mAb103

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người mAb103		Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người mAb67	
h103VL1	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép + K49E	h103VH1	(IGHV7-4-1*02+ IGHJ1*01) được ghép
h103VL2	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép+H36Y, K49E	h103VH2	(IGHV7-4-1*02+ IGHJ1*01) được ghép+R38K, E46K
h103VL3	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép+H36Y, L47V, K49E	h103VH3	(IGHV7-4-1*02+ IGHJ1*01) được ghép+V2I, R38K, E46K
h103VL4	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép +L4V, H36Y, L47V, K49E		
h103VL5	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép+H36Y, G43P, L47V, K49E, Y87I		
h103VL6	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép +L4V, H36Y, G43P, L47V,		

	K49E, Y87I		
h103VL7	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) được ghép +L4V, H36Y, G43P, L47V, K49E, E70D, Y87I		

Lưu ý: các vị trí axit amin trong bảng được đánh số bằng cách sử dụng hệ đánh số Kabat, ví dụ, K49E có nghĩa là K ở vị trí 49 được đột biến ngược thành E theo hệ đánh số Kabat; được ghép có nghĩa là các CDR kháng thể chuột được ghép vào các trình tự vùng FR dòng mầm của người.

Ngoài ra, đột biến D61S còn được đưa vào chuỗi nặng h103VH1 (tức là, đưa đột biến axit amin vào HCDR2 kháng thể để trình tự của HCDR2 kháng thể được thay đổi từ WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16) thành WINTYSGVPTYASDFKG (SEQ ID NO: 38)); và đột biến D56E được đưa vào chuỗi nhẹ h103VL3 (tức là, đưa đột biến axit amin vào LCDR2 kháng thể để trình tự của LCDR2 kháng thể được thay đổi từ LKKDGSHTGD (SEQ ID NO: 36) thành LKKDGSHTGE (SEQ ID NO: 64)), trong đó hoạt tính tốt của kháng thể vẫn được giữ lại.

Các trình tự đặc hiệu của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb103 được thể hiện trong bảng 11:

Bảng 11. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể chuột được làm tương thích với người mAb103

Vùng biến đổi số	Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể được làm tương thích với người mAb103
h103VH1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVWVRQAPGQ GLEWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISLKA AEDTAVYYCARKKTLTTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 65)
h103VH2	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVWVKQAPGQ GLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISLKA AEDTAVYYCARKKTLTTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 66)
h103VH3	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVWVKQAPGQG LKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISLKA EDTAVYYCARKKTLTTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 67)
h103VH4	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVWVRQAPGQ GLEWMGWINTYSGVPTYASDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISLKA EDTAVYYCARKKTLTTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68)

h103VL1	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWHQQQPEKGPR YLM <u>EL</u> KKDGSHTGDI P DRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY YCGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 69)
h103VL2	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPR YLM <u>EL</u> KKDGSHTGDI P DRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY YCGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 70)
h103VL3	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPR YV <u>ME</u> LKKDGSHTGDI P DRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY YCGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 71)
h103VL4	ELVVTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPR YV <u>ME</u> LKKDGSHTGDI P DRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY YCGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 72)
h103VL5	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKPPRY V <u>ME</u> LKKDGSHTGDI P DRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYIC GVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 73)
h103VL6	ELVVTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKPPR YV <u>ME</u> LKKDGSHTGDI P DRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYI CGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 74)
h103VL7	ELVVTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKPPR YV <u>ME</u> LKKDGSHTGDI P DRFSGSSSGA <u>DR</u> YLTISLQSEDEADY ICGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 75)
h103VL8	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPR YV <u>ME</u> LKKDGSHTG <u>E</u> GIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY YCGVGNTIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 76)

Lưu ý: các vùng CDR (được xác định bởi hệ đánh số Kabat) được gạch chân trong bảng, và các vị trí đột biến được in nghiêng đậm.

5. Tạo ra các kháng thể được làm tương thích với người

Các vector biểu hiện chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra, tương ứng; tiến hành sự kết hợp bắt cặp chéo trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người, dịch nổi nuôi cấy được thu gom và được tinh chế sau khi chuyển nhiễm các tế bào 293E để thu được kháng thể có chiều dài đầy đủ được làm tương thích với người. Vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người có thể được chọn từ nhóm bao gồm các vùng cố định của IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và các biến thể của chúng; theo cách được lấy làm minh họa, vùng cố định chuỗi nặng IgG1 của người (như nêu trong SEQ ID NO: 77) được nối với vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người nêu trên để tạo thành chuỗi nặng

có chiều dài đầy đủ của kháng thể. Vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người có thể được chọn từ nhóm bao gồm các vùng cố định của các chuỗi κ và λ hoặc các biến thể của chúng; theo cách được lấy làm minh họa, chuỗi κ của vùng cố định chuỗi nhẹ của người (như nêu trong SEQ ID NO: 78) hoặc chuỗi λ của vùng cố định chuỗi nhẹ của người (như nêu trong SEQ ID NO: 79) được nối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người nêu trên để tạo thành chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể.

Các trình tự vùng cố định của các kháng thể được lấy làm ví dụ là như sau:

Vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 của người:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 77

Chuỗi κ của vùng cố định của chuỗi nhẹ của người:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO: 78

Chuỗi λ của vùng cố định chuỗi nhẹ của người:

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSNKYYASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

SEQ ID NO: 79

Theo cách được lấy làm ví dụ minh họa, vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trên của kháng thể được làm tương thích với người thu được từ mAb47 như được thể hiện trong Bảng 5 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 để tạo thành chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người

được thể hiện trong Bảng 5 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nhẹ κ của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78 để tạo thành chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể, thu được loạt kháng thể được làm tương thích với người của mAb47 được thể hiện trong Bảng 12 dưới đây:

Bảng 12. Các kháng thể được làm tương thích với người của mAb47

VL \ VH	h47VH1	h47VH2	h47VH3	h47VH4
h47VL1	Hu47-1	Hu47-5	Hu47-9	Hu47-13
h47VL2	Hu47-2	Hu47-6	Hu47-10	Hu47-14
h47VL3	Hu47-3	Hu47-7	Hu47-11	Hu47-15
h47VL4	Hu47-4	Hu47-8	Hu47-12	Hu47-16

Lưu ý: trong bảng này, ví dụ, "Hu47-14" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được ký hiệu Hu47-14 là h47VL2, và vùng biến đổi chuỗi nặng là h47VH4; và trình tự vùng cố định chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 77, và trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 78.

Theo cách được lấy làm ví dụ minh họa, vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trên của kháng thể được làm tương thích với người thu được từ mAb63 như được thể hiện trong bảng 7 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 để tạo thành chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người như được thể hiện trong Bảng 7 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nhẹ κ của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78 để tạo thành chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể, thu được loạt kháng thể được làm tương thích với người của mAb63 được thể hiện trong bảng 13 dưới đây:

Bảng 13. Các kháng thể được làm tương thích với người của mAb63

VL \ VH	h63VH1	h63VH2	h63VH3	h63VH4	h63VH5
h63VL1	Hu63-1	Hu63-4	Hu63-7	Hu63-10	Hu63-13
h63VL2	Hu63-2	Hu63-5	Hu63-8	Hu63-11	Hu63-14
h63VL3	Hu63-3	Hu63-6	Hu63-9	Hu63-12	Hu63-15

Lưu ý: trong bảng này, ví dụ, "Hu63-13" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được ký hiệu Hu63-13 là h63VL1, và

vùng biến đổi chuỗi nặng là h63VH5; và trình tự vùng cố định chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 77, và trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 78.

Theo cách được lấy làm ví dụ minh họa, vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trên của kháng thể được làm tương thích với người thu được từ mAb67 như được thể hiện trong bảng 9 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 để tạo thành chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được làm tương thích với người được thể hiện trong Bảng 9 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nhẹ κ của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78 để tạo thành chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể, thu được loạt kháng thể được làm tương thích với người của mAb67 được thể hiện trong bảng 14 dưới đây.

Bảng 14. Các kháng thể được làm tương thích với người của mAb67

VL \ VH	VH		
	h67VH1	h67VH2	h67VH3
h67VL1	Hu67-1	Hu67-6	Hu67-11
h67VL2	Hu67-2	Hu67-7	Hu67-12
h67VL3	Hu67-3	Hu67-8	Hu67-13
h67VL4	Hu67-4	Hu67-9	Hu67-14
h67VL5	Hu67-5	Hu67-10	Hu67-15

Lưu ý: trong bảng này, ví dụ, "Hu67-14" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được ký hiệu Hu67-14 là h67VL4, và vùng biến đổi chuỗi nặng là h67VH3; và trình tự vùng cố định chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 77, và trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 78.

Theo cách được lấy làm ví dụ minh họa, vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trên của kháng thể được làm tương thích với người thu được từ mAb103 như được thể hiện trong bảng 11 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 để tạo thành chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người như được thể hiện trong bảng 11 được nối với đầu amino của vùng cố định chuỗi nhẹ λ của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể, thu được loạt kháng thể được làm tương thích với người của mAb103 được thể hiện trong bảng 15 dưới đây:

Bảng 15. Các kháng thể được làm tương thích với người của mAb103

VH VL	h103VH1	h103VH2	h103VH3	h103VH4
h103VL1	Hu103-1	Hu103-9	Hu103-17	Hu103-25
h103VL2	Hu103-2	Hu103-10	Hu103-18	Hu103-26
h103VL3	Hu103-3	Hu103-11	Hu103-19	Hu103-27
h103VL4	Hu103-4	Hu103-12	Hu103-20	Hu103-28
h103VL5	Hu103-5	Hu103-13	Hu103-21	Hu103-29
h103VL6	Hu103-6	Hu103-14	Hu103-22	Hu103-30
h103VL7	Hu103-7	Hu103-15	Hu103-23	Hu103-31
h103VL8	Hu103-8	Hu103-16	Hu103-24	Hu103-32

Lưu ý: trong bảng này, ví dụ, "Hu103-32" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được ký hiệu Hu103-32 là h103VL8, và vùng biến đổi chuỗi nặng là h103VH4; và trình tự vùng cố định chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 77, và trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 79.

Theo cách được lấy làm ví dụ minh họa, các trình tự có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ/chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người được thể hiện trong Bảng 16 dưới đây:

Bảng 16. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người

Kháng thể số	Trình tự chuỗi nặng	trình tự chuỗi nhẹ
Hu63-13	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDIF PKSGNTDYNRKFKDRVTMTTRDTSTSTV YMELSSLRSED TAVYYCARSGYGNVVF DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 80	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRTSQDINIYLN WYQQKPGKAPKLLIYY RSGLLSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQGNTLPPTFGGG TKVEIKRTVAAPS VFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC SEQ ID NO: 81

Hu47-14	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGY TFTTYGMSWVKQAPGQGLKWMGWIN TYSGVPTYASDFKGRFVFSLDTSVSTAY LQISSLKAEDTAVYYCARRGNYGRWDF DVWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 82	EIVLTQSPDFQSVTPKE KVTITCSVSSSTISSNLH WYQQKPDQSPKPLIYG TSNLAGSVPSRFSGSGS GTDYTLTINSLEAEDAA TYYCQQWSIYPLTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC SEQ ID NO: 83
Hu67-14	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY SFTDYHMNWKQMPGKGLEWMGDIN PDIGGTSYNQNFKGKVTISVDKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARWDFDSFAN WGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS LHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 84	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASESVSIIGTN LIHWYQQKPGKAPKLL IYHASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCLQSRKIPYTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC SEQ ID NO: 85
Hu103-32	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGY TFTTYGVIWVRQAPGQGLEWMGWINT YSGVPTYASDFKGRFVFSLDTSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARKKTLTTPW FAYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 86	ELVLTQSPSASASLGAS VKLTCTLSSQHSTYIE WYQQQPEKGPYVME LKKDGSHTGEGIPDRF SGSSSGAERYLTISLQS EDEADYYCGVGNTIKE QFVYVFGGGTKLTVLG QPKANPTVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADGSPVKAGVE TTKPSKQSNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS SEQ ID NO: 87

Lưu ý: trong bảng này, các chữ in nghiêng là các trình tự vùng cố định và các

chữ thẳng đứng là các trình tự vùng biến đổi.

Hiện tại 2 phân tử ADC hướng đích CEA đã biết là SAR-408701 và labetuzumab govitecan (cũng được dùng để chỉ là Lmab-CL2A-SN38), trong đó các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể là như sau:

Trình tự chuỗi nặng của kháng thể trong SAR-408701 (Sanofi):

EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWV
AYISSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDYAVYYCAAHYF
GSSGPFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 88

Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể trong SAR-408701 (viết tắt là Sanofi)

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYN
TRTLAEGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSSLQPEDFATYYCQHHYGTPTFTFGSGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 89

Trình tự chuỗi nặng của kháng thể Labetuzumab trong Lmab-CL2A-SN38 (viết tắt là Lmab)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEW
IGEIHPSSTINYAPSLKDRFTISRDNANTLFLQMDSLRPEDTGVIYFCASLYFG
FPWFAYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 90

Trình tự chuỗi nhẹ của Labetuzumab trong Lmab-CL2A-SN38 (Lmab)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIY
WTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFITFTISLQPEDATYYCQQYSLYRSFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID NO: 91

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

Ví dụ 4: Điều chế các hợp chất

Các quy trình thử nghiệm mà không nêu điều kiện cụ thể trong các ví dụ theo sáng chế, thường được tiến hành theo các phương pháp thông thường, hoặc các điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất các nguyên liệu ban đầu hoặc các sản phẩm thương mại. Các chất phản ứng mà không chỉ ra nguồn gốc cụ thể là các chất thông thường có nguồn gốc trên thị trường.

Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance-NMR) hoặc phép đo phổ khối (mass spectrometry-MS). Phổ NMR được đo bằng cách sử dụng thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AVANCE-400, với dimetyl sulfoxit được đơteri hóa (*DMSO-d₆*), clorofom được đơteri hóa (*CDCl₃*) và metanol được đơteri hóa (*CD₃OD*) làm các dung môi và tetrametylsilan (TMS) làm chất chuẩn nội. Độ dịch chuyển hóa học được thể hiện dưới dạng đơn vị 10^{-6} (ppm).

Phân tích MS được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị đo phổ khối FINNIGAN LCQAd (ESI) (nhà sản xuất: Thermo, loại: Finnigan LCQ advantage MAX).

Phân tích UPLC được tiến hành bằng cách sử dụng hệ thống đo phổ khối-sắc ký lỏng Waters Acquity UPLC SQD.

Phân tích HPLC được tiến hành bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1200DAD (cột sắc ký Sunfire C18 150 × 4,6 mm) và sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters 2695-2996 (cột sắc ký Gemini C18 150 × 4,6 mm).

Phân tích UV-HPLC được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị đo phổ khối sử dụng tia tử ngoại Thermo nanodrop2000.

Tỷ lệ ức chế tăng sinh và các giá trị IC_{50} được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa PHERA starFS (BMG, Đức).

Các đĩa silicagel Huanghai HSGF254 hay Qingdao GF254 có các thông số kỹ thuật nằm trong khoảng từ 0,15 mm đến 0,2 mm được chấp nhận để dùng cho phân tích sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography-TLC) và 0,4 mm đến 0,5 mm dùng cho phân tách và tinh chế TLC.

Silicagel Yantai Yellow có kích cỡ 200–300 mesh thường được sử dụng làm chất mang trong sắc ký cột.

Các nguyên liệu ban đầu đã biết theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng hoặc theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc có thể được mua từ các công ty ABCR GmbH & Co.KG, Acros Organics, công ty hóa chất Aldrich, Accela ChemBio Inc, Chembee Chemicals và hãng tương tự.

Trong các ví dụ, phản ứng được tiến hành trong môi trường khí argon hoặc môi trường khí nitơ trừ khi được quy định theo cách khác.

Môi trường khí argon hoặc môi trường khí nitơ có nghĩa là bình phản ứng được nối với bình cầu chứa khoảng 1 L khí argon hoặc khí nitơ.

Môi trường khí hydro có nghĩa là bình phản ứng được nối với bình cầu chứa khoảng 1 L khí hydro.

Thiết bị hydro hóa Parr 3916EKX, thiết bị hydro hóa Qinglan QL-500 hoặc thiết bị hydro hóa HC2-SS được sử dụng cho các phản ứng hydro hóa có áp suất.

Phản ứng hydro hóa thường bao gồm ba chu kỳ hút chân không và sục khí hydro.

Bình phản ứng vi sóng CEM Discover-S 908860 được sử dụng cho phản ứng vi sóng.

Trong các ví dụ, dung dịch phản ứng được dùng để chỉ dung dịch chứa nước trừ khi được quy định theo cách khác.

Trong các ví dụ, nhiệt độ phản ứng là nhiệt độ phòng trừ khi được quy định theo cách khác.

Nhiệt độ phòng là nhiệt độ phản ứng tối ưu, mà nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C.

Điều chế dung dịch đệm PBS ở độ pH 6,5 trong các ví dụ: 8,5 g KH_2PO_4 , 8,56 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5,85 g NaCl và 1,5 g EDTA được bổ sung vào bình phản ứng, và thể tích được tăng đến 2 L. Các chất bổ sung được hòa tan bằng sóng siêu âm, và dung dịch được trộn kỹ bằng cách lắc để thu được dung dịch đệm mong muốn.

Hệ giải hấp để tiến hành sắc ký cột và hệ dung môi hiện màu để tiến hành sắc ký lớp mỏng được dùng để tinh chế hợp chất bao gồm: A: hệ diclometan và isopropanol, B: hệ diclometan và metanol, và C: hệ ete dầu mỏ và etyl axetat. Tỷ lệ thể tích của các dung môi được điều chỉnh theo độ phân cực của hợp chất, hoặc bằng cách bổ sung một lượng nhỏ triethylamin và chất phản ứng axit hoặc bazơ.

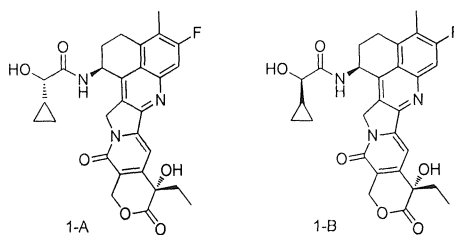
Một vài hợp chất theo sáng chế được xác định bằng phân tích Q-TOF LC/MS. Phân tích Q-TOF LC/MS sử dụng thiết bị đo phổ khối theo thời gian bay tứ cực với khối lượng chính xác Agilent 6530 và sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao Agilent 1290-Infinity (cột sắc ký Agilent Poroshell 300SB-C8 5 μm , $2,1 \times 75 \text{ mm}$).

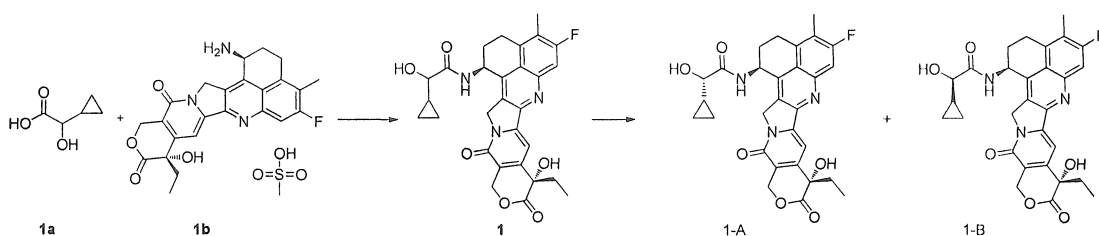
Phần được chất Y-D của thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế được tìm thấy trong đơn quốc tế số PCT/CN2019/107873, quy trình tổng hợp và các thử nghiệm của các hợp chất có liên quan được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ không giới hạn về quy trình tổng hợp được đưa vào đây bằng cách viện dẫn là như sau:

1. Tổng hợp các dược chất độc theo sáng chế

(*S*)-2-xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-etyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-2-hydroxyaxetamit 1-A

(*R*)-2-xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-etyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-2-hydroxyaxetamit 1-B





Bổ sung 2 mL etanol và 0,4 mL *N,N*-dimetylformamit vào hợp chất **1b** (4 mg, 7,53 μmol). Hệ phản ứng được sục khí argon ba lần, và hỗn hợp được làm lạnh đến 0-5°C trong bể nước đá, sau đó thêm nhỏ giọt 0,3 mL *N*-metylmorpholin. Khuấy hỗn hợp phản ứng cho đến khi trong. Bổ sung liên tục vào hỗn hợp phản ứng axit 2-xyclopropyl-2-hydroxyaxetic **1a** (2,3 mg, 19,8 μmol , được điều chế như được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số "WO2013106717"), 1-hydroxybenzotriazol (3 mg, 22,4 μmol) và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (4,3 mg, 22,4 μmol). Sau khi bổ sung, khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 0-5°C trong 1 giờ. Loại bỏ bể nước đá, và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 30°C, khuấy trong 2 giờ, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô **1** thu được bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện phân tách: cột sắc ký: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19 $\times$ 250 mm; pha động: A-nước (10 mmol of NH_4OAc), B-axetonitril, giải hấp theo gradien, tốc độ dòng: 18 mL/phút), và thu gom các phân đoạn tương ứng và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm (**1-A**: 1,5 mg, **1-B**: 1,5 mg).

MS m/z (ESI): 534,0 [$\text{M}+1$].

Hợp chất có cấu hình đơn **1-B** (thời gian lưu ngắn hơn)

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,06 phút; độ tinh khiết: 88% (cột sắc ký: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1 $\times$ 50 mm; pha động: A-nước (5 mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,37 (d, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,58-5,56 (m, 1H), 5,48 (d, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,32-5,29 (m, 2H), 3,60 (t, 1H), 3,19-3,13 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,20-2,14 (m, 1H), 1,98 (q, 2H), 1,87-1,83 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,34-1,28 (m, 1H), 0,86 (t, 3H), 0,50-0,39 (m, 4H).

Hợp chất có cấu hình đơn **1-A** (thời gian lưu dài hơn)

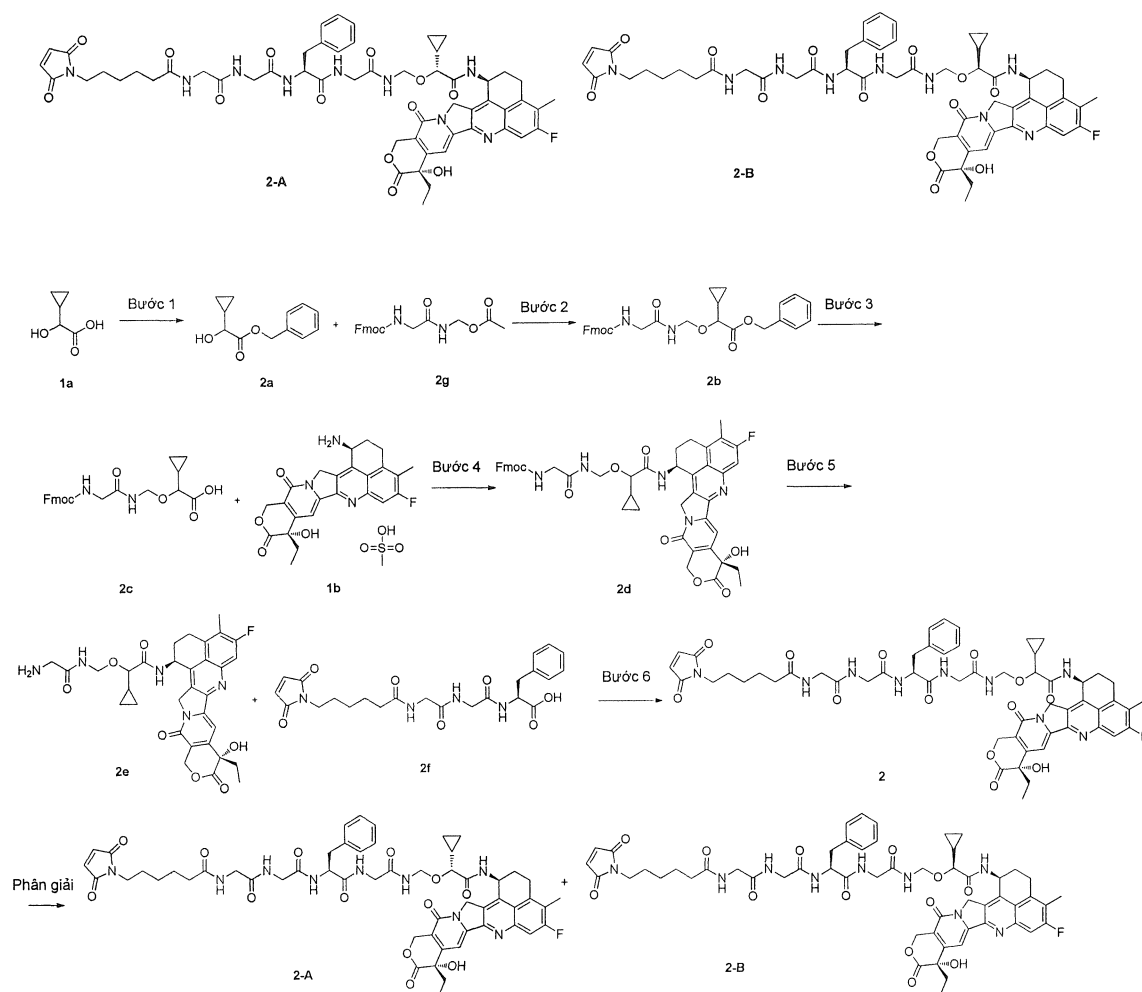
Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,10 phút; độ tinh khiết: 86% (cột sắc ký: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1 $\times$ 50 mm; pha động: A-nước (5 mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,35 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,58-5,53 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,37 (d, 1H), 5,32 (t, 1H), 3,62 (t, 1H), 3,20-3,15 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 2,25-2,16 (m, 1H), 1,98 (q, 2H), 1,87-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,21-1,14 (m, 1H), 0,87 (t, 3H), 0,47-0,35 (m, 4H).

2. Tổng hợp được chất gây độc có chất liên kết theo sáng chế

N-((2*R*,10*S*)-10-benzyl-2-xylopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-etyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-yl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamit 2-A

N-((2*S*,10*S*)-10-benzyl-2-xylopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-etyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-yl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamit 2-B



Bước 1

Benzyl 2-xylopropyl-2-hydroxyaxetat 2a

Hợp chất **1a** (1,3 g, 11,2 mmol; được điều chế như được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số "WO2013/106717") được hòa tan trong 50 mL axetonitril, và kali cacbonat (6,18 g, 44,8 mmol), benzyl bromua (1,33 mL, 11,2 mmol) và tetrabutylamoni iodua (413 mg, 1,1 mmol) được bổ sung liên tục. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ và lọc qua đệm xelit, và bánh lọc được rửa bằng etyl axetat (10 mL). Các dịch lọc được thu gom và cô trong điều kiện áp suất giảm, và tinh chế cạn thu được bằng sắc ký cột silicagel bằng hệ dung môi hiện màu C để thu được sản phẩm **2a** (2 g, hiệu suất 86,9%).

Bước 2

Benzyl

10-xyclopropyl-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oat **2b**

Hợp chất **2a** (120,9 mg, 0,586 mmol) và **2g** (180 mg, 0,489 mmol, được điều chế như được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số "CN105829346A") được bổ sung vào bình phản ứng, và 4 mL tetrahydrofuran được bổ sung. Hệ phản ứng được sục khí argon ba lần, và hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0-5°C trong bể nước đá, sau đó bổ sung kali *tert*-butoxit (109 mg, 0,98 mmol). Loại bỏ bể đá, và làm ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 40 phút, sau đó bổ sung 10 mL nước đá và chiết bằng etyl axetat (20 mL × 2) và cloroform (10 mL × 5). Các pha hữu cơ được thu gom và cô. Cạn thu được được hòa tan trong 4 mL dioxan, và 2 mL nước, natri bicacbonat (49,2 mg, 0,586 mmol) và 9-fluorenylmetyl cloformat (126 mg, 0,49 mmol) được bổ sung. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. 20 mL nước được bổ sung, sau đó chiết bằng etyl axetat (10 mL × 3). Rửa pha hữu cơ bằng dung dịch natri clorua bão hòa (20 mL), làm khô trên natri sulfat khan, và lọc. Cô dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế cạn thu được bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi phát hiện C để thu được sản phẩm **2b** (48 mg, hiệu suất 19%).

MS *m/z* (ESI): 515,0 [M+1].

Bước 3

Axit

10-xyclopropyl-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oic **2c**

Hợp chất **2b** (20 mg, 0,038 mmol) được hòa tan trong 4,5 mL hỗn hợp dung môi chứa tetrahydrofuran và etyl axetat (V:V = 2:1), và paladi trên nguyên tử cacbon (12 mg, mức tải 10%, trên cơ sở khô) được bổ sung. Hệ phản ứng được sục khí hydro

ba lần, và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng qua đệm xelit, và bánh lọc được rửa bằng etyl axetat. Cô dịch lọc để thu được sản phẩm nêu ở đề mục thô **2c** (13 mg), mà được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS m/z (ESI): 424,9 $[M+1]$.

Bước 4

(9*H*-fluoren-9-yl)ethyl(2-(((1-xyclopropyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-etyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-2-oxoethoxy)etyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate **2d**

Hợp chất **1b** (10 mg, 18,8 μmol) được bổ sung vào bình phản ứng, và 1 mL *N,N*-dimetylformamit được bổ sung. Hệ phản ứng được sục khí argon ba lần, và hỗn hợp được làm lạnh đến 0-5°C trong bể nước đá, sau đó bổ sung nhỏ giọt triethylamin, hợp chất thô **5c** (13 mg, 30,6 μmol), và 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholinium clorua (16,9 mg, 61,2 μmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong bể đá trong 40 phút. 10 mL nước được bổ sung, sau đó chiết bằng etyl axetat (10 mL $\times$ 3). Thu gom pha hữu cơ, rửa dung dịch natri clorua bão hòa (10 mL $\times$ 2), làm khô trên natri sulfat khan, và lọc. Cô dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế cạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng bằng hệ dung môi hiện màu B để thu được sản phẩm **2d** nêu ở đề mục (19 mg, hiệu suất 73,6%).

MS m/z (ESI): 842,1 $[M+1]$.

Bước 5

2-((2-Aminoaxetamido)metoxy)-2-xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-etyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)axetamit **2e**

Hợp chất **2d** (19 mg, 22,6 μmol) được hòa tan trong 2 mL diclometan, và 1 mL diethylamin được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và cô trong điều kiện áp suất giảm. 1 mL toluen được bổ sung, sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm; các trình tự này được lặp lại hai lần. Tạo huyền phù đặc cạn với 3 mL *n*-hexan và để yên. Sau đó, loại bỏ dịch nổi, và giữ lại chất rắn. Cô cạn rắn trong điều kiện áp suất giảm và làm khô bằng cách sử dụng bơm hút dầu để thu được sản phẩm thô nêu ở đề mục **2e** (17 mg), mà được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS m/z (ESI): 638,0 [M+18].

Bước 6

N-((2*R*,10*S*)-10-benzyl-2-xylopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-ethyl-5-oxo-9-hydroxy-4-ethyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-yl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamid 2-A

N-((2*S*,10*S*)-10-benzyl-2-xylopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-ethyl-5-oxo-9-hydroxy-4-ethyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-yl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamid 2-B

Hợp chất thô 2e (13,9 mg, 22,4 μ mol) được hòa tan trong 0,6 mL *N,N*-dimethylformamid. Hệ phản ứng được súc khí argon ba lần, và làm lạnh dung dịch đến 0-5 °C trong bể nước đá. Dung dịch 2f (21,2 mg, 44,8 μ mol, được điều chế như được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số "EP2907824") trong 0,3 mL *N,N*-dimethylformamid được bổ sung, sau đó bổ sung 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium clorua (18,5 mg, 67,3 μ mol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong bể đá trong 10 phút. Sau đó, loại bỏ bể đá, và làm ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 1 giờ để thu được hợp chất 2. Tinh chế hỗn hợp phản ứng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện phân tách: cột sắc ký: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19 $\times$ 250 mm; pha động: A-nước (10 mmol NH₄OAc), B-axetonitril, giải hấp theo gradien, tốc độ dòng: 18 mL/phút). Các phân đoạn tương ứng được thu gom và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được các sản phẩm nêu ở đề mục (2-A: 2,4 mg, 2-B: 1,7 mg).

MS m/z (ESI): 1074,4 [M+1].

Hợp chất có cấu hình đơn 2-A (thời gian lưu ngắn hơn):

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,14 phút; độ tinh khiết: 85% (cột sắc ký: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μ m 2,1 $\times$ 50 mm; pha động: A-nước (5 mmol NH₄OAc), B-axetonitril).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,60 (t, 1H), 8,51-8,49 (d, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,96 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,15 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,74-4,62 (m, 1H), 4,54-4,40 (m, 2H), 3,76-3,64 (m, 4H), 3,62-3,48

(m, 2H), 3,20-3,07 (m, 2H), 3,04-2,94 (m, 1H), 2,80-2,62 (m, 12H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,15 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 2H), 1,93-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,87 (t, 3H), 0,64-0,38 (m, 4H).

Hợp chất có cấu hình đơn 2-B (thời gian lưu dài hơn):

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,16 phút; độ tinh khiết: 89% (cột sắc ký: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1 $\times$ 50 mm; pha động: A-nước (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitril).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,68-8,60 (m, 1H), 8,58-8,50 (m, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,94 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,13 (m, 3H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,60-5,50 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 2H), 4,78-4,68 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 2H), 3,76-3,58 (m, 4H), 3,58-3,48 (m, 1H), 3,20-3,10 (m, 2H), 3,08-2,97 (m, 2H), 2,80-2,72 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,13 (m, 2H), 2,13-2,04 (m, 2H), 2,03-1,94 (m, 2H), 1,91-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 4H), 0,91-0,79 (m, 3H), 0,53-0,34 (m, 4H).

Ví dụ 5: Điều chế thể liên hợp kháng thể dược chất (Antibody Drug Conjugate-ADC)

Phân tích mức tải dược chất của dung dịch gốc ADC

Mục đích và nguyên tắc thử nghiệm

Dung dịch gốc ADC là dược chất được liên kết chéo với kháng thể, và cơ chế điều trị bệnh của chúng là vận chuyển các phân tử độc vào tế bào tùy thuộc vào hoạt động hướng đích của kháng thể để giết tế bào. Mức tải dược chất đóng một vai trò quyết định đối với hiệu quả của dược chất. Mức tải dược chất của dung dịch gốc ADC được xác định bằng phương pháp UV.

Các quy trình thử nghiệm

Cuvet chứa dung dịch natri succinat được đặt trong ô đối chứng và ô mẫu, và mức hấp thụ của dung môi trống được triệt tiêu. Sau đó, cuvet chứa dung dịch thử nghiệm được đặt vào ô mẫu, và mức hấp thụ ở bước sóng 280 nm và 370 nm được xác định.

Tính toán các kết quả: khả năng tải của dung dịch gốc ADC được xác định bằng phép đo phổ khối bằng tia tử ngoại (thiết bị: Thiết bị đo phổ khối bằng tia tử ngoại Thermo nanodrop2000), dựa trên nguyên tắc là tổng mức hấp thụ của dung dịch gốc ADC ở bước sóng nhất định là tổng các giá trị hấp thụ của dược chất và kháng thể đơn

dòng ở bước sóng đó, đó là:

$$(1) A_{280\text{ nm}} = \varepsilon_{\text{mab-280}}bC_{\text{mab}} + \varepsilon_{\text{Drug-280}}bC_{\text{Drug}}$$

$\varepsilon_{\text{Drug-280}}$: hệ số suy giảm mol trung bình của dược chất ở bước sóng 280 nm là 5100;

C_{Drug} : nồng độ dược chất;

$\varepsilon_{\text{mab-280}}$: hệ số suy giảm mol trung bình của dung dịch gốc chứa kháng thể đơn dòng ở bước sóng 280 nm là 214.600;

C_{mab} : nồng độ của dung dịch gốc chứa kháng thể đơn dòng;

b : độ dài đường quang học là 1 cm.

Tương tự, phương trình tính tổng mức hấp thu của mẫu ở bước sóng 370 nm có thể được đưa ra như sau:

$$(2) A_{370\text{ nm}} = \varepsilon_{\text{mab-370}}bC_{\text{mab}} + \varepsilon_{\text{Drug-370}}bC_{\text{Drug}}$$

$\varepsilon_{\text{Drug-370}}$: hệ số suy giảm mol trung bình của dược chất ở bước sóng 370 nm là 19.000;

C_{Drug} : nồng độ dược chất;

$\varepsilon_{\text{mab-370}}$: hệ số suy giảm của dung dịch gốc chứa kháng thể đơn dòng ở bước sóng 370 nm là 0;

C_{mab} : nồng độ của dung dịch gốc chứa kháng thể đơn dòng;

b : độ dài đường quang học là 1 cm.

Mức tải dược chất có thể được tính toán bằng cách sử dụng cả phương trình (1) và (2) cũng như là các hệ số suy giảm của kháng thể đơn dòng và dược chất ở cả bước sóng và nồng độ của chúng.

$$\text{Mức tải dược chất} = C_{\text{Drug}}/C_{\text{mab}}.$$

1. Điều chế thể liên hợp kháng thể dược chất (ADC) theo sáng chế

Hợp chất độc 1-B là chất ức chế ADN topoisomeraza I, và phức hợp được tạo thành bởi hợp chất độc, topoisomeraza I và ADN có thể làm đứt mạch đơn trong ADN, ngăn ngừa sự tái bản ADN và ức chế hiệu quả sự tăng sinh tế bào ở các tế bào.

ADC được điều chế như sau: kháng thể được làm tương thích với người (được chọn từ nhóm bao gồm Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 và Hu103-32) được đặt trong dung dịch đệm PBS chứa nước 0,05 M (trong đó kháng thể ở nồng độ bằng 10 mg/mL) ở độ pH 6,5, và dung dịch nước 10 mM chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) (Innochem, CAS: 51805-45-9, Cat # B45573) được bổ sung với lượng mol

bằng 5,3 lần lượng của kháng thể; hỗn hợp được để phản ứng trong tủ ủ có lắc ở nhiệt độ cố định bằng 37°C trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng trên được làm nguội xuống 25°C trong bể đá.

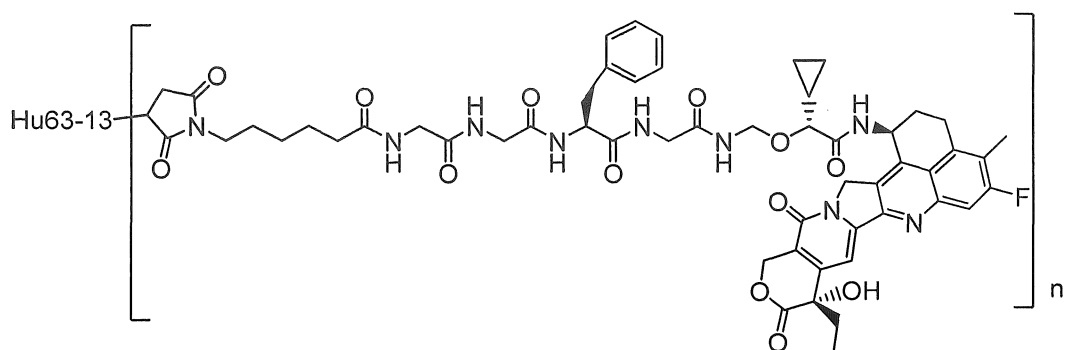
Hợp chất độc 2-A được hòa tan trong dimetyl sulfoxit với lượng mol bằng 15 lần lượng của kháng thể, và dung dịch thu được được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trên, sau đó được để cho phản ứng trên thiết bị lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ trước khi phản ứng được kết thúc. Hỗn hợp phản ứng được loại muối và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: dung dịch đệm PBS 0,05 M ở độ pH 6,5, chứa EDTA 0,01 M) để thu được phân tử thể liên hợp kháng thể được chất với tỷ lệ được chất so với kháng thể (DAR, giá trị n) bằng 6-8.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra các thể liên hợp với các giá trị DAR khác nhau bằng cách điều chỉnh các điều kiện phản ứng và các tác nhân phản ứng. Ví dụ, các phân tử ADC với tỷ lệ mol được chất so với kháng thể (DAR, giá trị n) bằng 3-5 được tạo ra bằng cách điều chỉnh tỷ lệ mol của kháng thể so với TCEP so với hợp chất độc bằng cách bổ sung dung dịch nước 10 mM chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) với lượng mol bằng 2,5 lần lượng của kháng thể và bổ sung hợp chất độc 2-A với lượng mol bằng 10 lần lượng của kháng thể.

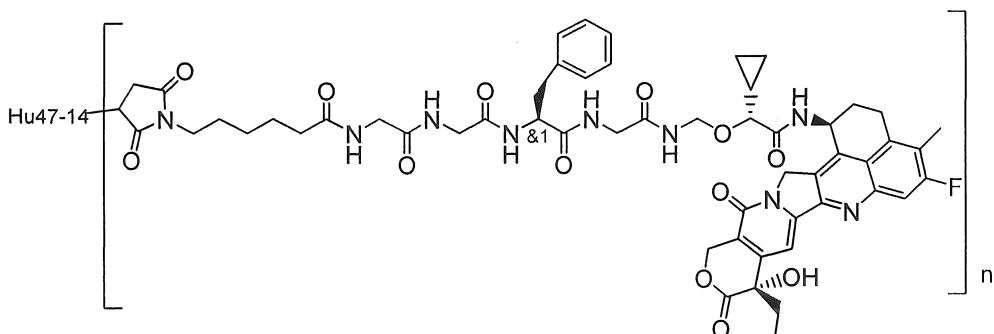
Các ADC đặc hiệu được điều chế như sau:

Các mẫu ADC	Kháng thể bao gồm	giá trị DAR (n)
Hu47-14-2-A	Hu47-14	6,6
Hu63-13-2-A	Hu63-13	6,29
Hu67-14-2-A	Hu67-14	6,41
Hu103-32-2-A	Hu103-32	6,94
Hu63-13-2-A	Hu63-13	3,97
Hu67-14-2-A	Hu67-14	4,28
Hu103-32-2-A	Hu103-32	4,8

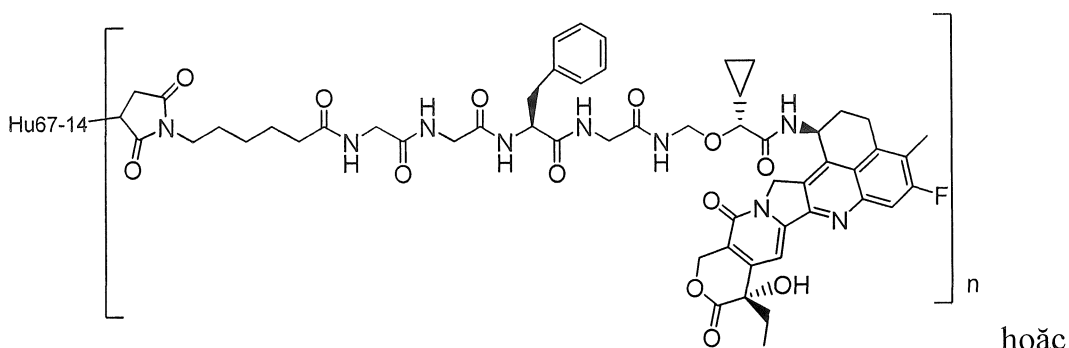
Hu63-13-2-A



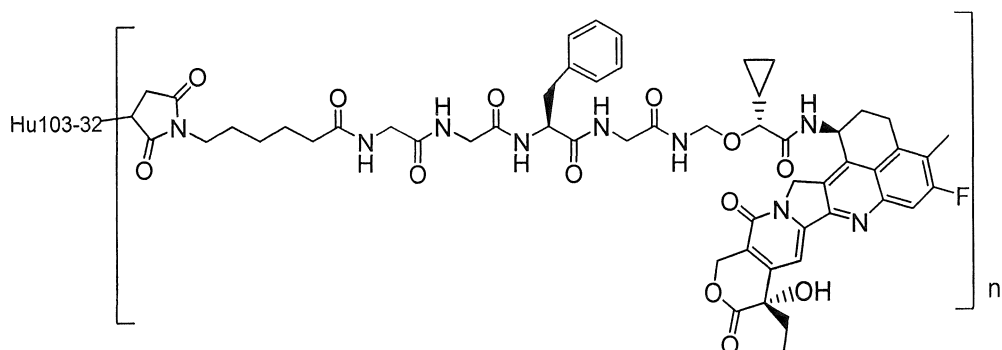
Hu47-14-2-A



Hu67-14-2-A



Hu103-32-2-A



Sáng chế cũng điều chế các ADC với các giá trị DAR khác nếu cần bởi các ví dụ thử nghiệm, xem các ví dụ thử nghiệm sau để biết thêm chi tiết.

2. Điều chế ADC đối chứng Lmab-CL2A-SN38 (ADC-4)

Để đánh giá sự khác nhau giữa ADC được tạo thành theo sáng chế và phân tử ADC đối chứng Lmab-CL2A-SN38, độc chất CL2A-SN38 được tổng hợp có dựa vào

cấu trúc được mô tả trong tài liệu *WHO Drug Information* Vol. 30, No. 1, 2016 và phương pháp được mô tả trong tài liệu *Mol pharm.* 2015 Jun 1;12(6):1836-47, và được tiếp hợp với Lmab để tạo thành các phân tử ADC Lmab-CL2A-SN38 với các giá trị DAR khác nhau bằng cách điều chỉnh các điều kiện phản ứng như được mô tả để điều chế các ADC trên đây. Các phân tử ADC điều chế được bảo quản ở nhiệt độ -20°C để sử dụng sau đó.

Các ví dụ thử nghiệm

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm gắn kết FACS

Để phát hiện sự gắn kết của kháng thể với protein CEA trên bề mặt tế bào, hoạt tính gắn kết của kháng thể được xác định bằng FACS sử dụng các tế bào biểu hiện CEA trên bề mặt tế bào. Các tế bào được thu hoạch và được ly tâm ở tốc độ 400 g ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút. PBS đã làm lạnh sơ bộ chứa FBS ở nồng độ cuối bằng 10% được bổ sung, và hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 400 g ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút; các trình tự này được lặp lại hai lần. Các tế bào được nhân giống trong đĩa có 96 lỗ ở mật độ 10^5 tế bào/lỗ, và 100 μ L dung dịch kháng thể đã pha loãng theo gradien được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 60 phút và được ly tâm, và loại bỏ dịch nổi. 250 μ L PBS đã làm lạnh sơ bộ chứa FBS ở nồng độ cuối bằng 10% được bổ sung vào mỗi lỗ để tái huyền phù tế bào, và ly tâm huyền phù ở tốc độ 400 g ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút, sau đó loại bỏ dịch nổi; các trình tự này được lặp lại hai lần. 50 μ L kháng thể thứ cấp IgG dê kháng người Alexa Fluor@488 (H+L) đã pha loãng theo tỷ lệ 1:200 (Lifetechnologies, Cat # A11013) được bổ sung. Ủ đĩa trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C trong 45 phút và ly tâm, và loại bỏ dịch nổi. 250 μ L PBS đã làm lạnh sơ bộ chứa FBS ở nồng độ cuối bằng 10% được bổ sung vào mỗi lỗ để tái huyền phù tế bào, và ly tâm huyền phù ở tốc độ 400 g ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút; các trình tự này được lặp lại hai lần. 100 μ L PBS đã làm lạnh sơ bộ được bổ sung vào mỗi lỗ để tái huyền phù tế bào. Đĩa được phân tích bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy (BD, FACSverse) để xác định các giá trị tín hiệu huỳnh quang. Các giá trị cao hơn chứng tỏ hoạt tính gắn kết của kháng thể với protein trên bề mặt tế bào cao hơn. Các đường cong gắn kết được lập đồ thị bằng cách sử dụng phần mềm phân tích PRISM dựa trên các kết quả thử nghiệm, và các giá trị EC_{50} của hoạt tính gắn kết của kháng thể với các protein bề mặt tế bào CEA của người (các tế bào ung thư dạ dày của người MKN45, Nanjing Kebai Biotechnology Co., Ltd., Cat # CBP60488), cynoCEA-CHO và

CEACAM1-CHO được tạo ra bằng cách khớp thông số. Hoạt tính gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người được thể hiện trong các bảng 17 và 18 dưới đây:

Bảng 17. Hoạt tính gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người với các protein trên bề mặt tế bào CEA của các loài khác nhau

Các kháng thể	EC ₅₀ (nM)		
	MKN45	cynoCEA-CHO	CEACAM1-CHO
Hu63-13	2,93	1,71	Không gắn kết
Hu47-14	4,19	2,70	Không gắn kết
Hu67-14	1,58	2,89	Không gắn kết
Hu103-32	1,79	1,24	Không gắn kết
Sanofi	2,64	17,27	Không gắn kết
Lmab	2,45	Không gắn kết	Không gắn kết

Các kết quả của hoạt tính gắn kết của các kháng thể khác được làm tương thích với người với các protein CEA trên bề mặt tế bào (MKN45 và cynoCEA-CHO) được thể hiện trong bảng 18 dưới đây:

Bảng 18. Hoạt tính gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người với các protein CEA trên bề mặt tế bào

Các kháng thể	EC ₅₀ (nM)		Các kháng thể	EC ₅₀ (nM)	
	MKN45	cynoCEA-CHO		MKN45	cynoCEA-CHO
Hu103-1	2,37	2,49	Hu47-6	2,50	0,30
Hu103-2	2,18	1,26	Hu47-10	2,27	0,27
Hu103-3	1,91	1,18	Hu63-1	4,23	1,24
Hu103-4	2,62	1,32	Hu63-2	3,73	2,64
Hu103-5	2,38	1,47	Hu63-3	3,56	2,01
Hu103-6	1,27	1,56	Hu63-4	5,18	1,95
Hu103-7	2,20	1,62	Hu63-5	3,70	2,14
Hu103-9	2,95	1,61	Hu63-6	3,71	2,88
Hu103-10	2,23	1,00	Hu63-8	3,24	2,43
Hu103-11	2,71	0,92	Hu63-9	4,87	2,47

Hu103-12	2,38	1,08	Hu63-10	4,95	1,88
Hu103-13	2,53	1,01	Hu63-11	4,35	2,29
Hu103-14	2,41	1,37	Hu63-12	4,04	2,23
Hu103-15	2,13	1,36	Hu67-1	2,46	4,57
Hu103-17	2,92	1,52	Hu67-4	3,25	3,06
Hu103-18	2,75	0,89	Hu67-5	2,86	3,50
Hu103-19	2,42	0,96	Hu67-7	3,88	7,20
Hu103-20	2,19	0,98	Hu67-9	3,75	3,72
Hu103-21	1,34	1,17	Hu67-10	3,19	5,37
Hu103-22	3,64	1,02	Hu67-11	2,26	4,66
Hu103-23	2,90	0,93	Hu67-12	3,20	5,31

Các kết quả thử nghiệm chỉ ra rằng các kháng thể được làm tương thích với người được sàng lọc theo sáng chế vẫn giữ được hoạt tính gắn kết tương tự so với hoạt tính gắn kết của các kháng thể chuột, và toàn bộ các kháng thể này có thể được gắn kết với các protein CEA người trên bề mặt tế bào; và các kháng thể được làm tương thích với người đã sàng lọc theo sáng chế có thể gắn kết với các protein CEA của khí trên bề mặt tế bào, và hoạt tính gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người với các protein CEA của khí là tốt hơn so với kháng thể đối chứng dương tính.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm về khả năng cạnh tranh với CEA hòa tan (sCEA)

Để thử nghiệm liệu các kháng thể có ưu tiên gắn kết với CEA trên bề mặt màng tế bào khi có mặt sCEA không, kháng thể đã pha loãng theo gradient và độ hòa tan nhất định của sCEA (5 $\mu\text{g/mL}$) được ủ sơ bộ trong 30 phút, và sau đó các tế bào MKN45 được thu hoạch và được nhân giống trong đĩa có 96 lỗ. Kháng thể đã pha loãng theo gradient và dung dịch đã trộn được ủ sơ bộ chứa kháng thể và sCEA được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 60 phút và được ly tâm, và loại bỏ dịch nổi. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS đã làm lạnh sơ bộ chứa FBS ở nồng độ cuối bằng 10%. 50 μL kháng thể thứ cấp IgG dê kháng người Alexa Fluor@488 (H + L) đã pha loãng theo tỷ lệ 1:200 (Lifetechnologies, Cat # A11013) được bổ sung. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 45 phút trong bóng tối và được ly tâm, và loại bỏ dịch nổi. Các tế bào được rửa hai lần bằng 250 μL PBS đã làm lạnh sơ bộ với FBS ở nồng độ cuối bằng 10%. 100 μL PBS đã làm lạnh sơ bộ được bổ sung vào mỗi lỗ để tái huyền phù tế

bào. Huyền phù được phân tích bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy (FACS) (BD, FACSverse) để xác định các giá trị tín hiệu huỳnh quang. Nếu tỷ lệ của tín hiệu huỳnh quang thu được khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA là nhỏ hơn 2 đối với mỗi nồng độ kháng thể, điều này chỉ ra rằng đường cong gắn kết của kháng thể không thay đổi đáng kể khi có mặt sCEA, và kháng thể vẫn ưu tiên gắn kết với CEA trên bề mặt màng tế bào. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong các bảng 19 và 20, trong đó tỷ lệ của giá trị tín hiệu huỳnh quang thu được khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA đối với các nồng độ khác nhau của Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14, Hu103-32 và các kháng thể Lmab đối chứng dương tính được thể hiện trong bảng 19 dưới đây, và tỷ lệ tối đa của giá trị tín hiệu huỳnh quang thu được khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA được thể hiện trong bảng 20 dưới đây:

Bảng 19. Tỷ lệ của giá trị tín hiệu huỳnh quang khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA của các kháng thể được làm tương thích với người

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ của các giá trị tín hiệu huỳnh quang				
	Hu63-13	Hu47-14	Hu67-14	Hu103-32	Lmab
40	0,92	1,09	0,94	0,91	1,10
1,6	1,36	1,18	1,73	1,67	2,78
0,32	1,59	1,23	1,78	1,24	5,18
0,064	1,59	1,24	1,25	1,44	4,15
0,0128	1,43	1,09	1,50	1,28	2,72
0,00256	1,24	1,15	1,58	1,09	1,74
0,000512	1,02	1,07	1,08	0,86	1,20

Bảng 20. Tỷ lệ tối đa của giá trị tín hiệu huỳnh quang thu được khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA của các kháng thể

Các kháng thể	Tỷ lệ tối đa của các tín hiệu huỳnh quang	Các kháng thể	Tỷ lệ tối đa của các tín hiệu huỳnh quang
Hu47-2	1,04	Hu103-1	1,30
Hu47-3	1,10	Hu103-2	1,17
Hu47-4	1,13	Hu103-3	1,14
Hu47-6	1,26	Hu103-4	1,17
Hu47-7	1,11	Hu103-5	1,15

Hu47-8	1,04	Hu103-6	1,15
Hu47-10	1,13	Hu103-7	1,07
Hu47-12	1,08	Hu103-9	1,57
Hu63-1	1,31	Hu103-10	1,19
Hu63-3	1,14	Hu103-11	1,16
Hu67-1	1,35	Hu103-12	1,24
Hu67-2	1,21	Hu103-13	1,16
Hu67-4	1,25	Hu103-14	1,10
Hu67-5	1,09	Hu103-15	1,23
Hu67-6	1,22	Hu103-17	1,12
Hu67-7	1,03	Hu103-18	1,22
Hu67-9	1,10	Hu103-19	1,36
Hu67-10	1,34	Hu103-20	1,22
Hu67-11	1,18	Hu103-21	1,27
Hu67-12	1,31	Hu103-22	1,33
Hu67-15	1,05	Hu103-23	1,31
mAb63	1,43	mAb103	1,02
mAb47	1,08	Sanofi	2,65

Các kết quả thử nghiệm chỉ ra rằng tỷ lệ của giá trị tín hiệu huỳnh quang khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA đối với các nồng độ khác nhau của các kháng thể được làm tương thích với người Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 và Hu103-32 là đều nhỏ hơn 2; ví dụ, tỷ lệ tối đa của Hu63-13 là 1,59, trong khi đó tỷ lệ tối đa của Lmab đối chứng dương tính là 5,18. Các kháng thể sàng lọc theo sáng chế là tốt hơn so với kháng thể đối chứng. Tỷ lệ tối đa của giá trị tín hiệu huỳnh quang thu được khi không có mặt sCEA so với khi có mặt sCEA của kháng thể được làm tương thích với người sàng lọc theo sáng chế là đều nhỏ hơn 2 và nhỏ hơn kháng thể đối chứng dương tính, mà chỉ ra rằng kháng thể được làm tương thích với người sàng lọc theo sáng chế sẽ ưu tiên gắn kết với CEA trên bề mặt màng tế bào khi có mặt sCEA và tốt hơn so với kháng thể đối chứng dương tính.

Ví dụ thử nghiệm 3: Xác định ái lực của kháng thể đối với CEA hòa tan sử dụng thiết bị Biacore

Ái lực của kháng thể được làm tương thích với người thử nghiệm đối với CEA

hòa tan của người và khi được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Biacore (GE, T200). Theo phương pháp nêu trong hướng dẫn sử dụng của kit bắt giữ kháng thể người (GE, Cat # BR-1008-39), kháng thể bắt giữ kháng thể người được liên hợp cộng hóa trị với chip cảm biến sinh học CM5 (GE, Cat # BR-1005-30) của thiết bị Biacore để bắt giữ bằng ái lực một lượng nhất định của kháng thể thử nghiệm, sau đó một dãy gradien nồng độ của các kháng nguyên CEA hòa tan được để cho chạy qua bề mặt của chip, và tín hiệu phản ứng được phát hiện trong thời gian thực bằng cách sử dụng Biacore, để thu được đường cong liên kết và phân ly. Sau mỗi chu kỳ phân ly được kết thúc, chip sinh học được rửa bằng tái tạo bằng dung dịch tái tạo được điều chế trong kit bắt giữ kháng thể người. Số liệu thu được từ thử nghiệm được khớp với mô hình Langmuir (1:1) bằng cách sử dụng phần mềm BIAevaluation phiên bản 4.1 để thu được các giá trị ái lực. Vì mong muốn rằng hoạt tính gắn kết của các kháng thể sàng lọc theo sáng chế với CEA trên bề mặt màng tế bào là lớn hơn so với CEA hòa tan, nên mong muốn ái lực của kháng thể với CEA hòa tan là thấp hơn. Các kết quả thử nghiệm ái lực của các kháng thể được làm tương thích với người với CEA hòa tan được thể hiện trong bảng 21 dưới đây:

Bảng 21. Ái lực của kháng thể được làm tương thích với người đối với CEA hòa tan của người

Các kháng thể	CEA hòa tan của người		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Hu63-13	2,99E+04	4,31E-03	1,44E-07
Hu47-14	1,31E+05	1,88E-01	1,43E-06
Hu67-14	3,76E+04	8,59E-03	2,28E-07
Hu103-32	3,33E+04	1,03E-03	3,11E-08
Sanofi	5,95E+04	3,08E-03	5,17E-08
Lmab	5,58E+04	3,31E-04	5,93E-09

Các kết quả thử nghiệm chỉ ra rằng các kháng thể được làm tương thích với người Hu63-13, Hu47-14 và Hu67-14 đều có ái lực thấp hơn đối với protein CEA hòa tan, thấp hơn đáng kể so với các kháng thể đối chứng Sanofi và Lmab. Điều này chứng tỏ là Hu63-13, Hu47-14 và Hu67-14 không được làm trung hòa một cách dễ dàng bởi CEA hòa tan trong máu *in vivo*, và một lượng lớn kháng thể có thể gắn kết với các tế bào biểu hiện CEA trên bề mặt màng tế bào.

Ví dụ thử nghiệm 4: Hoạt tính nhập bào của kháng thể kháng CEA ở tế bào biểu hiện nhiều CEA MKN45

Sau khi thể liên hợp chứa kháng thể kháng CEA theo sáng chế được nhập bào bởi các tế bào, thể liên hợp này có thể giải phóng ra độc tố để giết chết tế bào. Do đó, hoạt tính nhập bào của kháng thể CEA trong các tế bào biểu hiện CEA có thể thúc đẩy ADC gây ra hoạt tính. Để đánh giá hoạt tính nhập bào của các kháng thể được làm tương thích với người ở các tế bào MKN45, các tế bào MKN45 được cấy vào đĩa có 96 lỗ (corning, Cat # 3795) và được nuôi cấy qua đêm; các kháng thể CEA được làm tương thích với người Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 và Hu103-32 được nuôi cấy sơ bộ vào ngày tiếp theo với chất đánh dấu IgG của người màu xanh lá cây iFL (Invitrogen, Cat # Z25611) trong 15 phút, trong suốt quá trình thử nghiệm chất phản ứng iFL sẽ gắn kết với Fc của các kháng thể được làm tương thích với người; sau đó, các phức hợp của kháng thể và iFL được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào, và dung dịch nuôi cấy tế bào được loại bỏ sau 6 giờ và 24 giờ; các tế bào được rửa hai lần bằng PBS, được phân cắt và thu gom, và cường độ tín hiệu huỳnh quang trong các tế bào được phát hiện bằng kỹ thuật FACS. iFL gắn kết trên Fc của các kháng thể được đưa vào tế bào sau khi các kháng thể được nhập bào, và các tín hiệu huỳnh quang có thể được phát hiện trong môi trường axit sau khi iFL được nhập bào bởi các tế bào; nhờ đó, các tín hiệu được phát hiện càng mạnh chứng tỏ hoạt tính nhập bào của các kháng thể càng cao. Hoạt tính nhập bào của các kháng thể được làm tương thích với người được thể hiện trên FIG.1: toàn bộ các kháng thể được làm tương thích với người có thể được nhập bào bởi các tế bào MKN45, và theo thời gian càng ngày càng có nhiều kháng thể được nhập bào.

Ví dụ thử nghiệm 5: Khả năng gây độc tế bào của các ADC đối với các tế bào ung thư có mức biểu hiện CEA khác nhau

Sau khi liên hợp các kháng thể CEA được làm tương thích với người với độc tố 2-A, khả năng gây độc tế bào của mỗi ADC đối với các dòng tế bào ung thư có các mức biểu hiện CEA khác nhau được đánh giá. Các tế bào biểu hiện CEA ở mức cao MKN45, các tế bào biểu hiện CEA ở mức vừa phải LS174T và các tế bào không biểu hiện CEA HCT116 được cấy trong các đĩa có 96 lỗ; các mẫu ADC được pha loãng theo gradien được bổ sung vào các tế bào vào ngày tiếp theo, và các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 5 ngày. 50 µL chất phản ứng Cell Titer-Glo (Promega, Cat #

G9242) được bổ sung vào mỗi lỗ, và sau khi ủ trong 10 phút trong bóng tối, các tín hiệu huỳnh quang được phát hiện bằng bộ dò hình ảnh tế bào (BioTek, Cytation5). Đường cong ức chế được lập với các kết quả phát hiện được nhờ phần mềm phân tích PRISM, và được khớp số liệu để thu được giá trị IC_{50} cho biết hoạt tính ức chế của ADC chống lại sự tăng sinh tế bào. Khả năng gây độc tế bào của mỗi ADC được thể hiện như sau:

Bảng 22. Khả năng gây độc tế bào của các ADC đối với các tế bào có mức biểu hiện CEA khác nhau

Các mẫu ADC	DAR	IC_{50} (nM)			Tỷ lệ IC_{50}	
		MKN45 (với mức biểu hiện CEA cao)	LS174T (với mức biểu hiện CEA vừa phải)	HCT116 (không biểu hiện CEA)	HCT116/ LS174T	HCT116/ MKN45
Hu47-14-2-A	6,6	6,58	10,3	106,3	10,32	16,16
Hu63-13-2-A	6,29	3,933	13,08	87,64	6,70	22,28
Hu67-14-2-A	6,41	3,331	9,236	71,83	7,78	21,56
Hu103-32-2-A	6,94	2,998	2,374	78,1	32,90	26,05
Lmab-CL2A-SN38	7	0,665	0,3456	0,4276	1,24	0,64
Hu63-13-2-A	3,97	34,02	19,76	165,1	8,36	4,85
Hu67-14-2-A	4,28	9,388	15,58	71,95	4,62	7,66
Hu103-32-2-A	4,8	2,863	3,076	83,58	27,17	29,19
Lmab-CL2A-SN38	4,15	1,595	0,6618	1,059	1,60	0,66

Các phân tử ADC được tiếp hợp với độc tố 2-A thể hiện tính độc tế bào phụ thuộc vào mức biểu hiện CEA: mức biểu hiện CEA càng cao, thì khả năng ADC gây độc tế bào càng lớn. Trong khi đó, các ADC có các giá trị DAR cao và các giá trị DAR thấp có khả năng gây độc tế bào mạnh hơn đối với các tế bào biểu hiện CEA và khả năng gây độc tế bào yếu hơn đối với các tế bào không biểu hiện CEA. Phân tử ADC đối chứng Lmab-CL2A-SN38 có khả năng gây độc tế bào tương tự với tất cả ba dòng tế bào, chứng tỏ khả năng gây độc tế bào không đặc hiệu. Tỷ lệ IC_{50} có thể phản ánh gián tiếp độ an toàn của phân tử ADC. Tỷ lệ này càng lớn chứng tỏ rằng phân tử ADC càng ít độc đối với các tế bào không biểu hiện CEA và có thể an toàn hơn *in vivo*.

Ví dụ thử nghiệm 6: Tác dụng phụ và khả năng gây độc tế bào của ADC

Sau khi ADC được nhập bào vào tế bào, độc tố sẽ được giải phóng khỏi ADC để tạo ra tác dụng gây độc lên tế bào. Sau khi tế bào bị phân giải và chết, độc tố được giải phóng ra khỏi tế bào và tiếp tục đi vào các tế bào bên cạnh để tạo ra các tác dụng gây độc lên các tế bào này.

Để đánh giá tác dụng phụ và khả năng gây độc tế bào của ADC, dòng tế bào biểu hiện CEA với lượng cao MKN45 và dòng tế bào không biểu hiện CEA HCT116 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy có 6 lỗ trong 24 giờ, và sau đó mẫu ADC được bổ sung ở nồng độ cuối bằng 4 nM. Các tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ tế bào ở nhiệt độ 37°C thêm 5 ngày nữa. Các tế bào được phân giải bằng pancreatin và được thu gom, và kháng thể đơn dòng kháng CEA FITC (ThermoFisher, Cat # MA1-80578) được bổ sung ở nồng độ cuối bằng 10 µg/mL. Các tế bào được ủ trên đá trong bóng tối trong 1 giờ, rửa hai lần bằng PBS, và đếm bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy. Các tế bào mà tạo ra tín hiệu huỳnh quang là các tế bào MKN45 biểu hiện CEA và các tế bào không tạo ra tín hiệu là các tế bào HCT116 không biểu hiện CEA.

Các kết quả về tác dụng phụ và khả năng gây độc tế bào của các mẫu ADC được thể hiện trên FIG.2: toàn bộ các phân tử ADC có tác dụng phụ và khả năng gây độc tế bào mạnh. Nếu MKN45 và HCT116 được đồng nuôi cấy, các phân tử ADC có thể ức chế quá trình tăng sinh của cả hai loại tế bào, trong khi đó nếu HCT116 được nuôi cấy một mình, thì các phân tử ADC liên kết với 2-A về cơ bản không gây độc với các tế bào. Phân tử ADC đối chứng Lmab-CL2A-SN38 là rất độc đối với cả tế bào được đồng nuôi cấy và được nuôi cấy một mình.

Các giá trị DAR thu được của các phân tử ADC được sử dụng trong thử nghiệm này là như sau: Hu63-13-2-A DAR 6.29; Hu47-14-2-A DAR 6.6; Hu67-14-2-A DAR 6.41; Lmab-CL2A-SN38 DAR 7.0.

Ví dụ thử nghiệm 7: Hoạt tính ức chế *In Vivo* của các phân tử ADC chống lại các khối u

Hiệu quả *in vivo* của các phân tử ADC được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu khối u ghép ngoại lai LS174T và MKN45. Chuột chui lông BALB/c (loại SPF, Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd., Số chứng nhận: 201833814, số cấp phép: SCXK (Jiangsu) 2016-0010) được nhốt trong chu kỳ 12/12 giờ sáng/tối ở nhiệt độ 23±1°C với độ ẩm ở 40-50%, trong đó thức ăn (thức ăn được vô trùng tiêu chuẩn dành cho chuột) và nước được cấp tùy thích. Chuột được cho thích nghi với môi trường

phòng thí nghiệm trong 10 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm và sau đó được tiêm chủng tế bào LS174T (5×10^5 tế bào/chuột) hoặc tế bào MKN45 (4×10^6 tế bào/chuột) dưới da vào sườn bên phải. Các khối u được để cho phát triển đến kích thước bằng khoảng 150mm^3 , và sau đó chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm, mỗi nhóm có 8 con. Sau khi chia nhóm, chuột trong các nhóm thử nghiệm được tiêm qua đường trong màng bụng các mẫu ADC với liều 1 mg/kg hoặc 3 mg/kg, và các con trong nhóm đối chứng trống được tiêm qua đường trong màng bụng PBS, một liều duy nhất. Kích thước của các khối u trên chuột được quan sát, đo và ghi lại. Thể tích khối u (V) được tính toán như sau: $V = 1/2 \times L_{\text{dài}} \times L_{\text{ngắn}}^2$; thể tích khối u tương đối (relative tumor volume-RTV) = V_T/V_0 ; tỷ lệ ức chế khối u (%) = $(C_{\text{RTV}} - T_{\text{RTV}})/C_{\text{RTV}}$ (%); trong đó V_0 và V_T là các thể tích khối u ở thời điểm bắt đầu và kết thúc thử nghiệm, tương ứng; và C_{RTV} và T_{RTV} là các thể tích khối u tương đối của nhóm đối chứng trống và các nhóm thử nghiệm, tương ứng, tại thời điểm kết thúc thử nghiệm.

Đối với hiệu quả *in vivo*, so với PBS trong nhóm đối chứng, toàn bộ các phân tử ADC có tác dụng ức chế sự phát triển thể tích và khối lượng của khối u, theo cách phụ thuộc liều đến mức độ nào đó: tác dụng ức chế trên các khối u ở các nhóm 3-mpk là tốt hơn so với ở các nhóm 1-mpk. Trong mẫu khối u ghép ngoại lai LS174T, các kết quả được thể hiện trên FIG.3 (các thay đổi về thể tích khối u) và FIG.4 (khối lượng khối u vào ngày cuối): trong số các nhóm 3-mpk, Hu63-13-2-A có hiệu quả ức chế tốt nhất trên các khối u, sau đó là Hu47-14-2-A và tiếp đó là Hu67-14-2-A, và Lmab-CL2A-SN38 có tác dụng ức chế khối u kém nhất. Trong mẫu khối u ghép ngoại lai MKN45, các kết quả được thể hiện trên FIG.5 (các thay đổi về thể tích khối u) và FIG.6 (khối lượng khối u vào ngày cuối): trong số các nhóm 3-mpk, Hu67-14-2-A có hiệu quả ức chế tốt nhất trên các khối u, sau đó là Hu103-32-2-A và tiếp đó là Hu63-13-2-A, và Lmab-CL2A-SN38 có tác dụng ức chế khối u kém nhất.

Tỷ lệ ức chế khối u *in vivo* của các phân tử ADC được thể hiện trong các bảng 23 và 24 dưới đây: tỷ lệ ức chế khối u của ADC cho biết tác động đáng kể của liều; cụ thể là, ở mẫu khối u ghép ngoại lai LS174T, trong số các nhóm sử dụng liều thấp (1 mpk), Hu63-13-2-A có tỷ lệ ức chế khối u cao nhất (55,95%), sau đó là Hu67-14-2-A (43,71%), và Hu47-14-2-A có tỷ lệ ức chế khối u thấp nhất (23,04%); trong số các nhóm sử dụng liều cao (3 mpk), Hu63-13-2-A có tỷ lệ ức chế khối u cao nhất (77,13%), sau đó là Hu47-14-2-A (66,87%) và tiếp đó là Hu67-14-2-A (47,66%), và

Lmab-CL2A-SN38 có tỷ lệ ức chế khối u thấp nhất (33,44%); ở mẫu khối u ghép ngoại lai MKN45, trong số các nhóm dùng liều thấp (1 mpk), Hu67-14-2-A có tỷ lệ ức chế khối u cao nhất (15,88%), sau đó là Hu103-32-2-A (11,39%), và Hu63-13-2-A có tỷ lệ ức chế khối u thấp nhất (9,89%); trong số các nhóm dùng liều cao (3 mpk), Hu67-14-2-A có tỷ lệ ức chế khối u cao nhất (79,51%), sau đó là Hu103-32-2-A (74,66%) và tiếp đó là Hu63-13-2-A (60,26%), và Lmab-CL2A-SN38 có tỷ lệ ức chế khối u thấp nhất (13,51%).

Bảng 23. Các tỷ lệ ức chế khối u *in vivo* của ADC

Nhóm	DAR	Liều	Tỷ lệ ức chế khối u (%)	Giá trị P (so với nhóm đối chứng)
Nhóm đối chứng trống	NA	NA	NA	NA
Hu63-13-2-A	6,3	1 mpk	55,95%*	0,0159
Hu63-13-2-A	6,3	3 mpk	77,13%**	0,0013
Hu47-14-2-A	6,6	1 mpk	23,04%	0,4590
Hu47-14-2-A	6,6	3 mpk	66,87%**	0,0052
Hu67-14-2-A	6,13	1 mpk	43,71%	0,0561
Hu67-14-2-A	6,13	3 mpk	47,66%	0,0794
Lmab-CL2A-SN38	7,0	3 mpk	33,44%	0,1791

Lưu ý: * có nghĩa là $P < 0,05$, ** có nghĩa là $P < 0,01$, và NA có nghĩa là không áp dụng.

Bảng 24. Tỷ lệ ức chế khối u *in vivo* của ADC ở mẫu khối u ghép ngoại lai MKN45

Nhóm	DAR	Liều	Tỷ lệ ức chế khối u (%)	Giá trị P (so với nhóm đối chứng)
Nhóm đối chứng trống	NA	NA	NA	NA
Hu63-13-2-A	6,3	1 mpk	9,89%	0,6492
Hu63-13-2-A	6,3	3 mpk	60,26%*	0,0124
Hu67-14-2-A	6,13	1 mpk	15,88%	0,5336
Hu67-14-2-A	6,13	3 mpk	79,51%**	0,0087
Hu103-32-2-A	6,94	1 mpk	11,39%	0,5219
Hu103-32-2-A	6,94	3 mpk	74,66%**	0,0033
Lmab-CL2A-SN3	7,0	3 mpk	13,51%	0,4980

8				
---	--	--	--	--

Lưu ý: * có nghĩa là $P < 0,05$, ** có nghĩa là $P < 0,01$, và NA có nghĩa là không áp dụng.

Ví dụ thử nghiệm 8: Nghiên cứu dược động học *in vivo* của các phân tử ADC

Nghiên cứu dược động học *in vivo* được tiến hành ở chuột SD. Chuột SD (Shanghai Sippr-BK Laboratory Animal Co. Ltd.) được chia ngẫu nhiên vào các nhóm mỗi nhóm 3 con, và thuốc được sử dụng bằng cách tiêm qua đường trong tĩnh mạch ở liều 3 mg/kg. 0,3 mL mẫu máu toàn phần được thu gom từ các nhóm sử dụng ở các thời điểm sau: trước khi sử dụng, và 5 phút, 8 giờ, 1 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi sử dụng, và không bổ sung chất chống đông. Mẫu máu toàn phần thu gom được để ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút và ly tâm ở tốc độ 1000g trong 15 phút, và dịch nổi được thu gom, đặt trong ống EP và bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Nồng độ máu trong huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ELISA, và các thông số dược động học được tính toán cho các thuốc thử nghiệm bằng phần mềm Winnolin. Các kết quả thu được được thể hiện như sau:

Bảng 25. Các thông số dược động học *in vivo* của các phân tử ADC

Các mẫu	Hu63-13-2-A (DAR 6,8)		Hu47-14-2-A (DAR 6,72)		Hu67-14-2-A (DAR 6,7)		Hu103-32-2-A (DAR 6,91)	
	ADC nguyên vẹn	Các kháng thể	ADC nguyên vẹn	Các kháng thể	ADC nguyên vẹn	Các kháng thể	ADC nguyên vẹn	Các kháng thể
Các thông số	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình
t _{1/2} (h)	169,7	192,7	158,5	188,8	170,8	180,6	135,19	157,87
t _{1/2} (d)	7,1	8,0	6,6	7,9	7,1	7,5	5,63	6,58
C _{max} (ug/ml)	62,9	67,6	51,5	55,2	50,8	49,6	64,94	66,35
AUC 0-t (ug/ml*h)	4280	4949	3283	3444	4037	4038	3609	3235
AUC 0-∞ (ug/ml*h)	4600	5451	3456	3741	4309	4356	3699	3357
V _z (ml/kg)	159,8	153,0	198,3	218,8	171,9	179,9	160,09	206,29
CL(ml/day/kg)	15,7	13,2	20,9	19,3	16,8	16,6	19,70	21,75
MRT 0-∞ (h)	212,1	239,0	184,7	216,6	226,6	237,7	144,63	160,14

Toàn bộ các phân tử ADC có các đặc tính dược động học tốt, và thời gian bán thải của các kháng thể lâu hơn chút so với phân tử ADC. Thời gian bán thải *in vivo* của Hu63-13-2-A là 7,1 ngày, và thời gian bán thải của kháng thể là 8 ngày; thời gian bán thải *in vivo* của Hu47-14-2-A là 6,6 ngày, và thời gian bán thải của kháng thể là 7,9 ngày; thời gian bán thải *in vivo* của Hu67-14-2-A là 7,1 ngày, và thời gian bán thải của kháng thể là 7,5 ngày; thời gian bán thải *in vivo* của Hu103-32-2-A là 5,63 ngày, và thời gian bán thải của kháng thể là 6,58 ngày.

Ví dụ thử nghiệm 9: Nghiên cứu độ ổn định *in vitro* của các phân tử ADC trong huyết tương

Để đánh giá độ ổn định *in vitro* của các phân tử ADC trong huyết tương, các phân tử ADC được bổ sung vào huyết tương của người và của khỉ ở nồng độ 100 µg/mL, và hỗn hợp được để yên ở nhiệt độ 37°C trong 21 ngày. Các mẫu hỗn hợp được lấy ra một lần một tuần, và được phân tích bằng LC/MS/MS (hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao LC-30AD của Shimadzu; thiết bị đo phổ khối liên tiếp ba lần tứ cực API4000 của Applied Biosystems) để xác định lượng độc tố tự do trong huyết tương. Các kết quả phát hiện là như sau:

Bảng 26. Tỷ lệ phần trăm độc tố trong huyết tương

Tỷ lệ phần trăm độc tố trong huyết tương (%)												
	Hu63-13-2-A (DAR 7,24)			Hu47-14-2-A (DAR 6,85)			Hu67-14-2-A (DAR 6,7)			Hu103-32-2-A (DAR 6,05)		
Ngày	BSA	Người	Khỉ	BSA	Người	Khỉ	BSA	Người	Khỉ	BSA	Người	Khỉ
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,93	0,38
14	0	0,21	0	0	0,28	0	0	0,18	0,21	0	0,78	0,92
21	0	0,32	0,4	0	0,34	0,29	0	0,4	0,24	0	1,13	0,96

Kết quả phát hiện bằng 0 có nghĩa là lượng độc tố tự do trong huyết tương là thấp hơn giới hạn dưới của ngưỡng phát hiện và không thể phát hiện ra. Toàn bộ các phân tử ADC đều có độ ổn định tốt trong huyết tương của người và của khỉ. Lượng độc tố tự do trong huyết tương của người và khỉ đối với Hu63-13-2-A là 0,32% và 0,4%, tương ứng, sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 21 ngày; lượng độc tố tự do trong huyết tương của người và của khỉ đối với Hu47-14-2-A là 0,34% và 0,29%, tương ứng; lượng độc tố tự do trong huyết tương của người và của khỉ đối với Hu67-14-2-A là 0,4% và 0,24%, tương ứng; lượng độc tố tự do trong huyết tương của người và của

khí đối với Hu103-32-2-A là 1,13% và 0,96%, tương ứng.

Ví dụ thử nghiệm 10: Thử nghiệm khả năng ức chế sự tăng sinh *in vitro* của các tế bào khối u bằng các hợp chất

I. Mục đích

Thử nghiệm này được dự định là kiểm tra hoạt tính ức chế của các dược chất theo sáng chế chống lại sự tăng sinh *in vitro* của các tế bào U87MG (Cell Bank, Chinese Academy of Sciences, Cat # TCHu138) và các tế bào khối u SK-BR-3 (tế bào ung thư vú của người, ATCC, Cat # HTB-30). Các tế bào được điều trị *in vitro* bằng hợp chất ở các nồng độ khác nhau. Sau 6 ngày nuôi cấy, sự tăng sinh tế bào được kiểm tra nhờ các tác nhân phản ứng CTG (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Cat # G7573), và hoạt tính *in vitro* của hợp chất này được đánh giá theo giá trị IC₅₀.

II. Phương pháp

Thử nghiệm ức chế sự tăng sinh *in vitro* của các tế bào U87MG được tiến hành như là một ví dụ để minh họa phương pháp theo sáng chế để kiểm tra hoạt tính ức chế của các hợp chất theo sáng chế chống lại sự tăng sinh *in vitro* của các tế bào khối u. Phương pháp này cũng có thể áp dụng được cho, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế chống lại sự tăng sinh *in vitro* của các tế bào khối u khác.

1. Nuôi cấy tế bào: Các tế bào U87MG và SK-BR-3 được nuôi cấy trong môi trường EMEM (GE, Cat # SH30024.01) chứa 10% FBS và môi trường McCoy's 5A (Gibco, Cat # 16600-108) chứa 10% FBS, tương ứng.

2. Chuẩn bị tế bào: Các tế bào U87MG và SK-BR-3 phát triển ở pha logarit được rửa một lần bằng PBS (dung dịch đệm phosphat, Shanghai BasalMedia Technologies Co., LTD.) và sau đó phân cắt bằng 2–3 mL trypsin (0,25% Trypsin-EDTA (1×), Gibco, Life Technologies) trong 2–3 phút. Sau khi các tế bào được phân giải hoàn toàn, 10-15 mL môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung để rửa giải các tế bào đã phân cắt. Hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 1000 rpm trong 5 phút, và dịch nổi được loại bỏ. Sau đó các tế bào được tái huyền phù trong 10-20 mL môi trường nuôi cấy tế bào để thu được huyền phù tế bào đơn.

3. Cấy tế bào: các huyền phù tế bào đơn U87MG và SK-BR-3 được trộn kỹ trong mỗi lỗ và điều chỉnh bằng môi trường nuôi cấy tế bào đến mật độ tế bào bằng

$2,75 \times 10^3$ tế bào/mL và $8,25 \times 10^3$ tế bào/mL, tương ứng. Huyền phù tế bào đã điều chỉnh được trộn kỹ trong mỗi lỗ và được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ ở mật độ 180 μL /lỗ. Chỉ 200 μL môi trường được bổ sung vào các lỗ ngoại biên của đĩa có 96 lỗ. Đĩa được ủ trong tủ ủ trong 24 giờ (37°C , 5% CO_2).

4. Chuẩn bị hợp chất: hợp chất được hòa tan trong DMSO (dimethyl sulfoxit, Shanghai Titan Scientific Co., Ltd.) để chuẩn bị dung dịch gốc ở nồng độ ban đầu bằng 10 mM.

Các hợp chất phân tử nhỏ được chuẩn bị ở nồng độ ban đầu bằng 500 nM như sau.

Các mẫu thử nghiệm khác nhau ở nồng độ 100 μM (30 μL) được bổ sung vào cột thứ nhất của đĩa có đáy hình chữ U có 96 lỗ, và 20 μL DMSO được bổ sung vào mỗi lỗ của cột thứ hai đến cột thứ mười một. Các mẫu trong cột thứ nhất (10 μL) được bổ sung vào 20 μL DMSO trong cột thứ hai, và hỗn hợp này được trộn kỹ. 10 μL hỗn hợp được bổ sung vào cột thứ ba, và v.v. đến cột thứ mười. Các hợp chất trong đĩa (5 μL mỗi) được chuyển vào môi trường EMEM (95 μL), và hỗn hợp được trộn kỹ để sử dụng sau đó.

ADC được chuẩn bị ở nồng độ ban đầu bằng 10 nM hoặc 500 nM như sau.

Các mẫu thử nghiệm khác nhau ở nồng độ 100 nM hoặc 5 μM (100 μL) được bổ sung vào cột thứ nhất của đĩa có 96 lỗ, và 100 μL PBS được bổ sung vào mỗi lỗ của cột thứ hai đến cột thứ mười một. Các mẫu trong cột thứ nhất (50 μL) được bổ sung vào 100 μL PBS trong cột thứ hai, và hỗn hợp này được trộn kỹ. 50 μL hỗn hợp đã pha loãng ba lần được bổ sung vào cột thứ ba, và v.v. đến cột thứ mười.

5. Bổ sung mẫu: các mẫu thử nghiệm được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau (20 μL) được bổ sung vào đĩa nuôi cấy, mỗi mẫu được bổ sung vào hai lỗ. Đĩa được ủ trong tủ ủ trong 6 ngày (37°C , 5% CO_2).

6. Hiện màu: đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ được lấy ra, và 90 μL dung dịch CTG được bổ sung vào mỗi lỗ, sau đó ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

7. Đọc đĩa: đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ được lấy ra và kiểm tra trên máy đọc vi đĩa (BMG labtech, PHERAstar FS) để xác định mức phát quang hóa học.

III. Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và Graphpad Prism 5. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 27. Các giá trị IC_{50} của các đoạn phân tử nhỏ theo sáng chế trong việc ức chế sự tăng sinh *in vitro* của các tế bào SK-BR-3 và các tế bào U87

Hợp chất số	IC_{50} (nM)	
	SK-BR-3	U87
Thời gian lưu ngắn hơn 1-B	0,33	0,86
Thời gian lưu dài hơn 1-A	8,11	2,31

Kết luận: các đoạn phân tử nhỏ theo sáng chế có hoạt tính ức chế đáng kể chống lại sự tăng sinh của các tế bào SK-BR-3 và các tế bào U87, và các tâm bất đối có ảnh hưởng nhất định đến hoạt tính ức chế của các hợp chất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ liên hợp kháng thể được chất, bao gồm: kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được liên hợp với được chất độc tùy ý bằng yếu tố liên kết, trong đó kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng; hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 23, tương ứng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, tương ứng.

2. Thẻ liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CEA là kháng thể chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

3. Thẻ liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

4. Thẻ liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 hoặc 52; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53, 54 hoặc 55.

5. Thẻ liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng

CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53.

6. Thể liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CEA là kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung thu được từ kháng thể người hoặc biến thể vùng khung của nó, và biến thể vùng khung này có các đột biến ngược gồm tối đa 10 axit amin trong vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người.

7. Thể liên hợp kháng thể được chất theo điểm 6, trong đó vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2V, 42G, 44V và 71Y, và/hoặc vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F và 82A R; trong đó các vị trí của các đột biến ngược được đánh số theo sơ đồ đánh số Kabat.

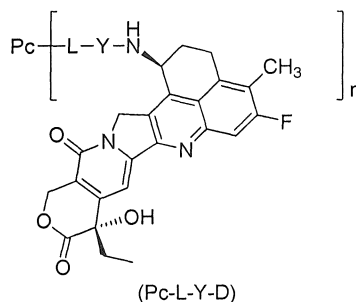
8. Thể liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể.

9. Thể liên hợp kháng thể được chất theo điểm 8, trong đó vùng cố định chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các vùng cố định của IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người và các biến thể thông thường của chúng, và vùng cố định chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các vùng cố định chuỗi κ và λ của kháng thể người và các biến thể thông thường của chúng.

10. Thể liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó kháng thể bao gồm vùng cố định chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 và vùng cố định chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78 hoặc SEQ ID NO: 79.

11. Thẻ liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CEA bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81.

12. Thẻ liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 1, trong đó thẻ liên hợp kháng thể dược chất là thẻ liên hợp kháng thể dược chất có công thức chung (Pc-L-Y-D):



trong đó:

Y là $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đoteri, halogen và C_{1-6} alkyl;

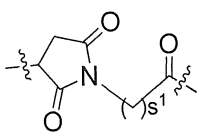
R^1 là C_{3-6} xycloalkyl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm hydro và C_{3-6} xycloalkyl;

hoặc, R^1 và R^2 , cùng với các nguyên tử cacbon được liên kết với nó, tạo thành C_{3-6} xycloalkyl;

m là 0 hoặc 1; n là một số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10;

L là đơn vị liên kết $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, trong đó

L^1 là , và s^1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

L^2 là liên kết hóa học;

L^3 là gốc tetrapeptit;

L^4 là $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, trong đó R^5 , R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập là hydro hoặc C_{1-6} alkyl, và t là 1 hoặc 2;

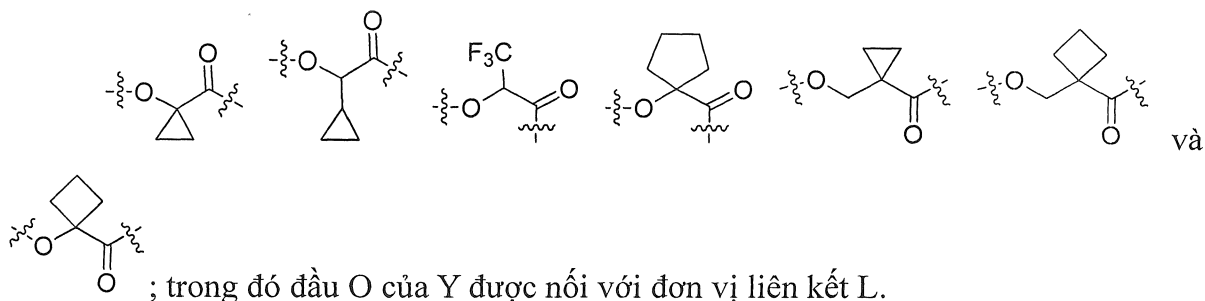
trong đó đầu L^1 được nối với Pc, và đầu L^4 được nối với Y;

Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được nêu trong điểm 1.

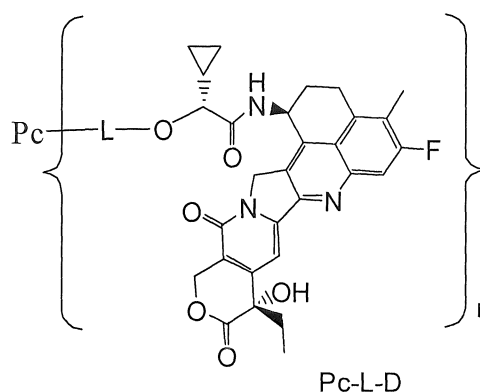
13. Thẻ liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 12, trong đó n là một số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

14. Thể liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 12, trong đó n là một số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 4 đến 6.

15. Thể liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 12, trong đó Y được chọn từ nhóm bao gồm:



16. Thể liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 12, trong đó thể liên hợp kháng thể dược chất là thể liên hợp kháng thể dược chất có công thức chung (Pc-L-D):



trong đó:

Pc là kháng thể kháng CEA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được nêu trong điểm 1;

n là số thập phân hoặc số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10;

L là đơn vị liên kết $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, trong đó

L^1 là , và s^1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

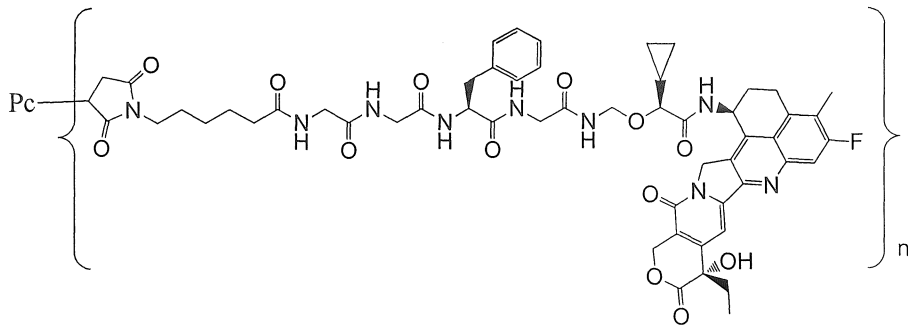
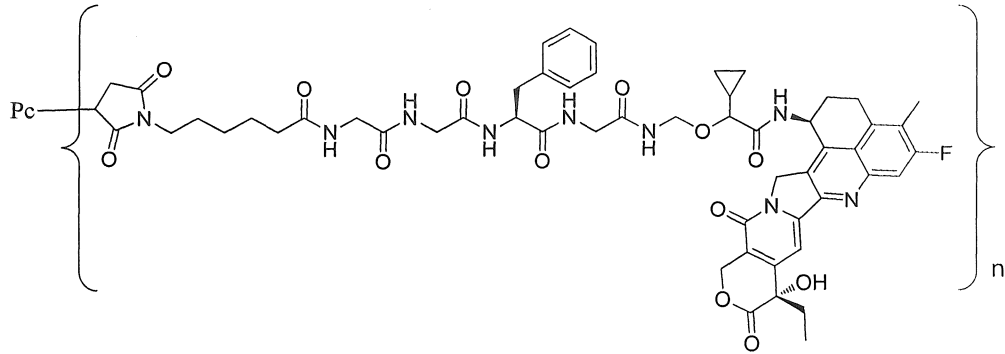
L^2 là liên kết hóa học;

L^3 là gốc tetrapeptit;

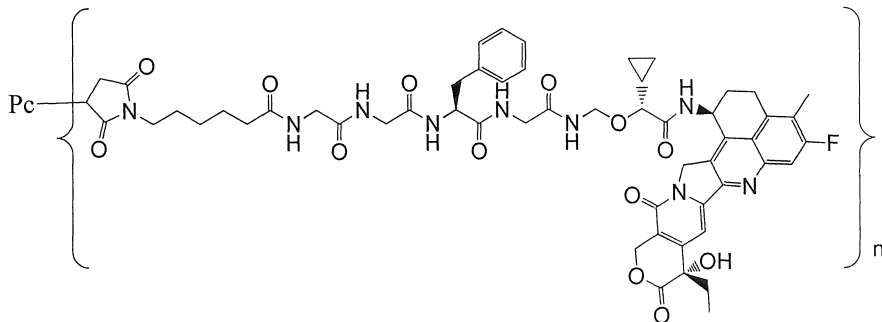
L^4 là $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, trong đó R^5 , R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi nhóm độc lập là hydro hoặc C_{1-6} alkyl, và t là 1 hoặc 2;

trong đó đầu L^1 được nối với Pc.

17. Thể liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 12, trong đó thể liên hợp kháng thể dược chất được chọn từ nhóm bao gồm:

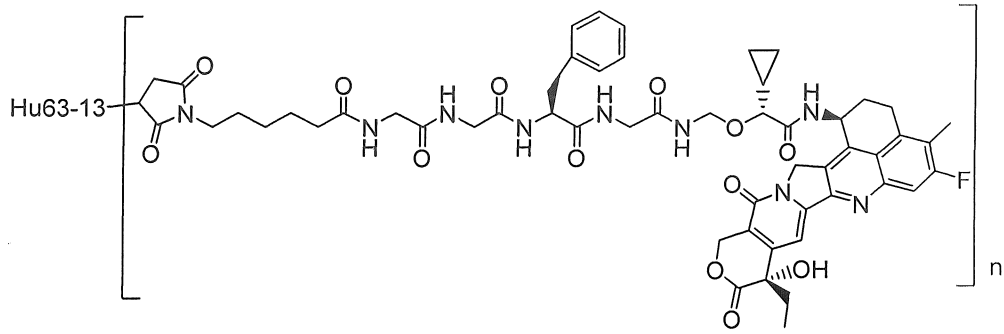


và



trong đó Pc và n là như được nêu trong điểm 12.

18. Thể liên hợp kháng thể dược chất theo điểm 12, trong đó thể liên hợp kháng thể dược chất là như sau:



Hu63-13 bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, và chuỗi

19. Dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18 và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

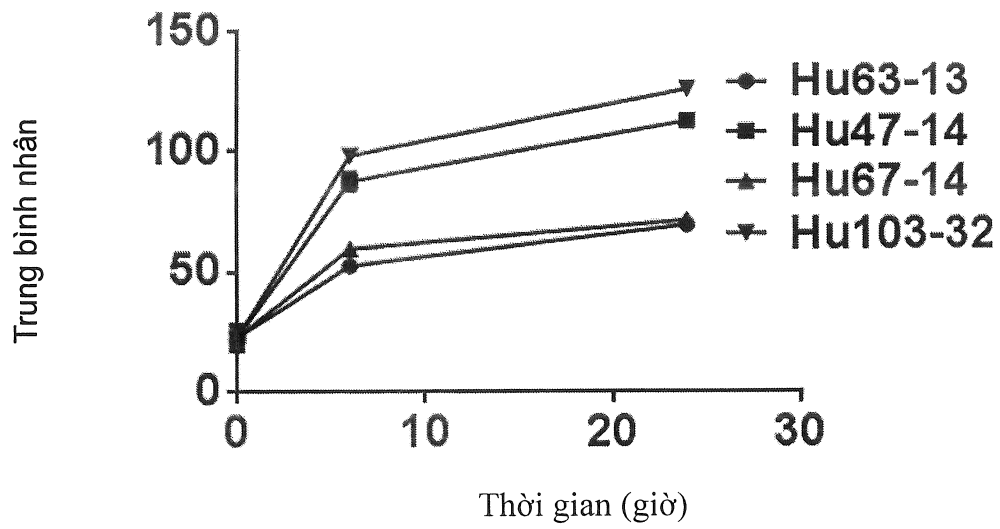


FIG.1

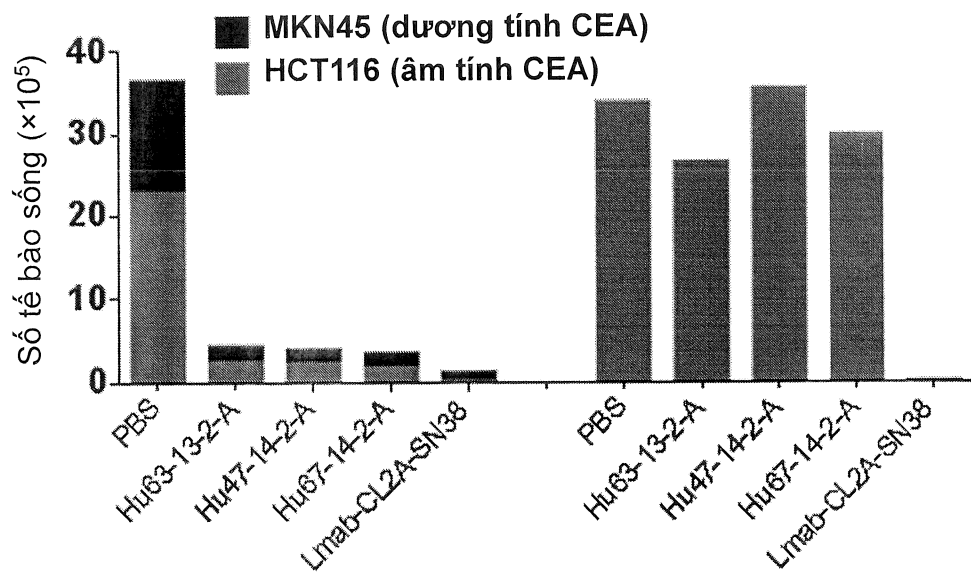


FIG.2

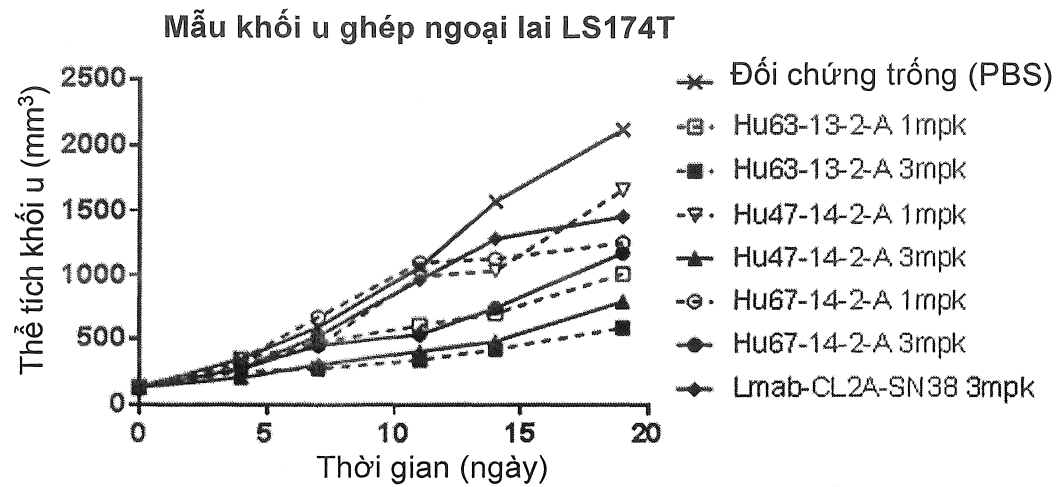


FIG.3

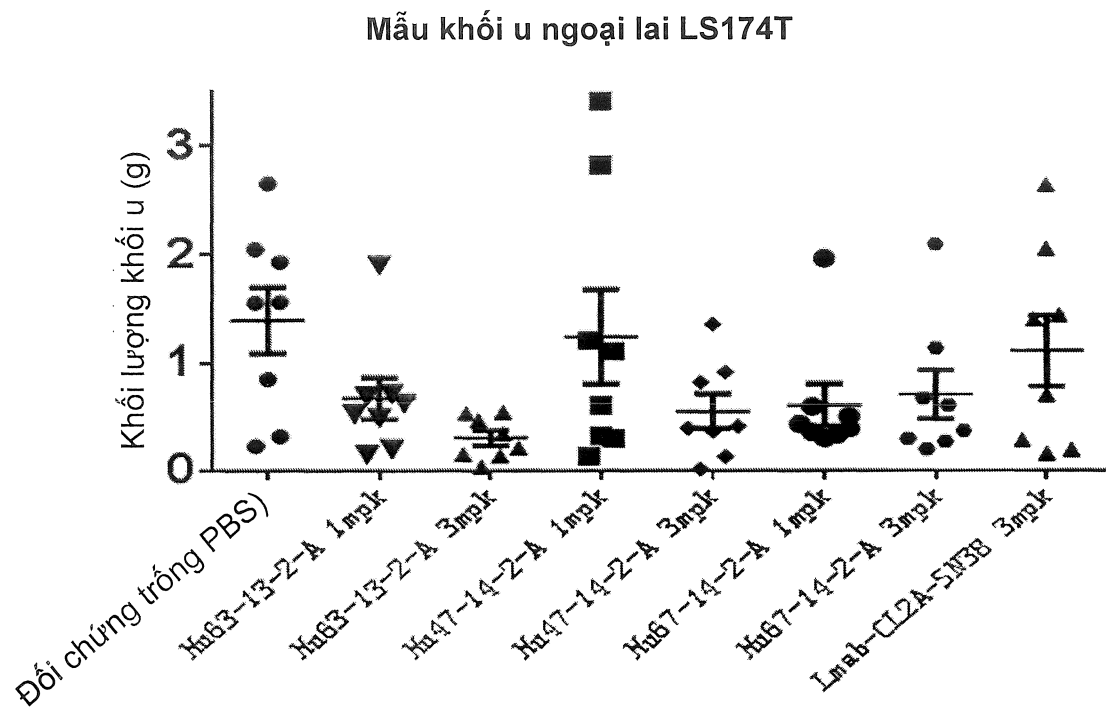


FIG.4

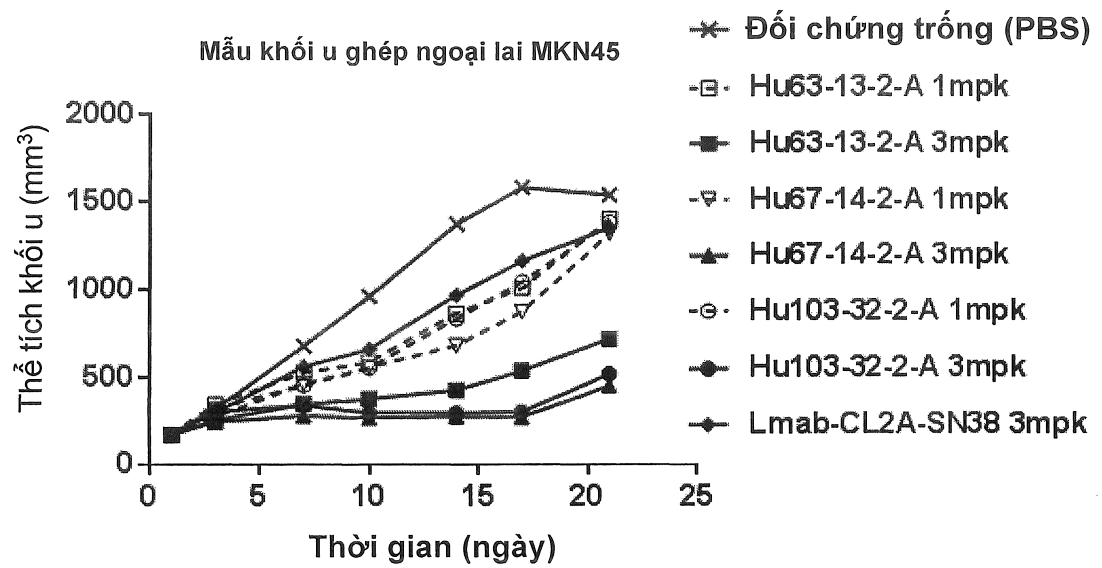


FIG.5

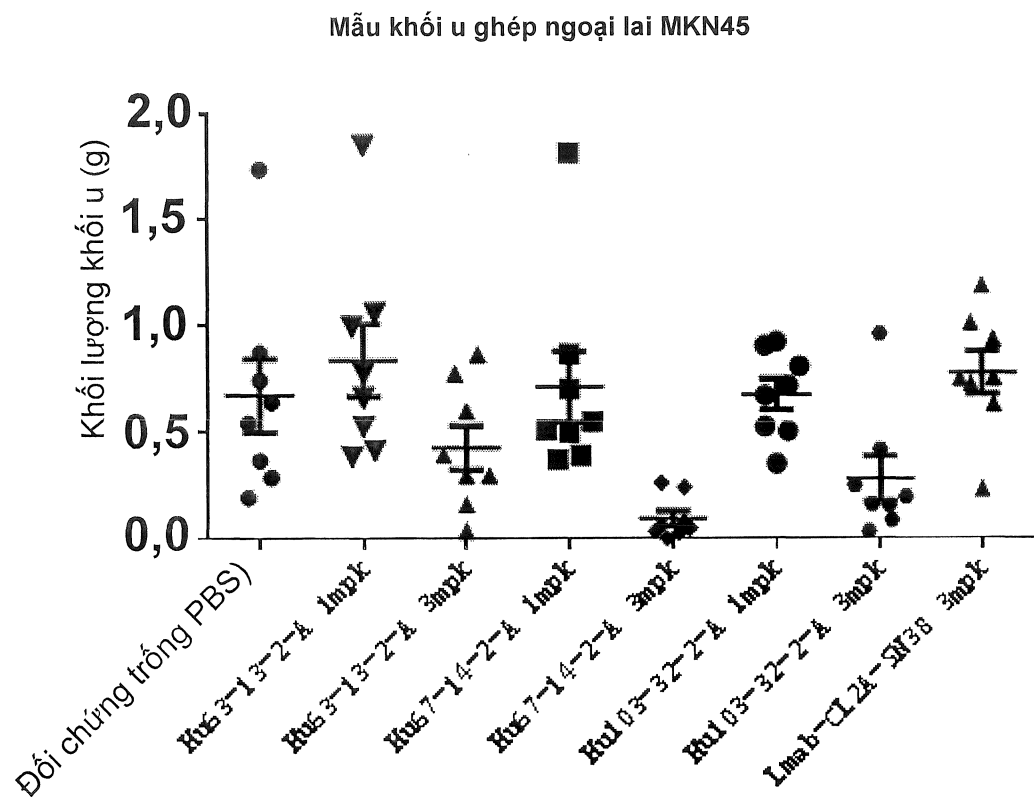


FIG.6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.
Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.
- <120> THẺ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ DƯỢC CHẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THẺ LIÊN HỢP NÀY
- <130> 702139CPCT
- <160> 92
- <170> Danh mục trình tự SIPO 1.0
- <210> 1
<211> 657
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<221> PEPTIT
<223> Trình tự protein của CEA người-His (hCEA-His)
- <400> 1
Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15
Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30
Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35 40 45
Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60
Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65 70 75 80
Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95
Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110
Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125
Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
130 135 140
Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175
Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
180 185 190
Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205
Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220
Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225 230 235 240
Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255
Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
260 265 270
Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
275 280 285
Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu

```

      290              295              300
Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr
305              310              315              320
Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
      325              330              335
Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
      340              345              350
Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp
      355              360              365
His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
      370              375              380
Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
385              390              395              400
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
      405              410              415
Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn
      420              425              430
Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser
      435              440              445
Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala
      450              455              460
Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
465              470              475              480
Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
      485              490              495
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
      500              505              510
Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
      515              520              525
Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
      530              535              540
Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
545              550              555              560
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
      565              570              575
Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
      580              585              590
Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
      595              600              605
Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
      610              615              620
Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
625              630              635              640
Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala His His His His His
      645              650              655
His

```

```

<210> 2
<211> 883
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> PEPTIT
<223> Trình tự protein của CEA người-Fc (hCEA-Fc)

```

```

<400> 2
Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1              5              10              15

```

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
 35 40 45
 Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
 50 55 60
 Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
 65 70 75 80
 Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110
 Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125
 Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140
 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175
 Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
 180 185 190
 Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
 195 200 205
 Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
 210 215 220
 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255
 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
 260 265 270
 Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
 275 280 285
 Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu
 290 295 300
 Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr
 305 310 315 320
 Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 325 330 335
 Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 340 345 350
 Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp
 355 360 365
 His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
 370 375 380
 Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
 385 390 395 400
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 405 410 415
 Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn
 420 425 430
 Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser
 435 440 445
 Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala
 450 455 460
 Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
 465 470 475 480
 Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
 485 490 495
 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg

```

      500      505      510
Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
      515      520      525
Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
      530      535      540
Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
545      550      555      560
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
      565      570      575
Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
      580      585      590
Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
      595      600      605
Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
      610      615      620
Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
625      630      635      640
Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Glu Pro Lys Ser Ser
      645      650      655
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
      660      665      670
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
      675      680      685
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
      690      695      700
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
705      710      715      720
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
      725      730      735
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
      740      745      750
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
      755      760      765
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
770      775      780
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
785      790      795      800
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
      805      810      815
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
      820      825      830
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      835      840      845
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      850      855      860
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
865      870      875      880
Pro Gly Lys

```

<210> 3

<211> 660

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> PEPTIT

<223> Trình tự protein của CEA khi cynomolgus-His (cynoCEA-His)

<400> 3

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
 20 25 30
 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
 35 40 45
 Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
 50 55 60
 Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80
 Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110
 Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125
 Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140
 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
 180 185 190
 Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
 195 200 205
 Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
 210 215 220
 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255
 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
 260 265 270
 Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu
 275 280 285
 Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys
 290 295 300
 Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 305 310 315 320
 Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu
 325 330 335
 Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn
 340 345 350
 Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg
 355 360 365
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
 370 375 380
 Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn
 385 390 395 400
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe
 405 410 415
 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 420 425 430
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
 435 440 445
 Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val
 450 455 460
 Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
 465 470 475 480
 Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr

```

      485              490              495
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg
      500              505              510
Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
      515              520              525
Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser
      530              535              540
Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp
545              550              555              560
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn
      565              570              575
Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
      580              585              590
Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
      595              600              605
Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser
      610              615              620
Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val
625              630              635              640
Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala His His
      645              650              655
His His His His
      660

```

<210> 4

<211> 702

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> PEPTIT

<223> Trình tự protein của CEA người được biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO (hCEA-CHO)

<400> 4

```

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

```

```

      195              200              205
Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
  210              215              220
Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
  225              230              235              240
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
      245              250              255
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
      260              265              270
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
      275              280              285
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
      290              295              300
Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
  305              310              315              320
Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
      325              330              335
Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
      340              345              350
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
      355              360              365
Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
      370              375              380
Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser
  385              390              395              400
Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
      405              410              415
Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
      420              425              430
Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
      435              440              445
Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
      450              455              460
Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
  465              470              475              480
Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
      485              490              495
Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
      500              505              510
Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
      515              520              525
Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
      530              535              540
Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
  545              550              555              560
Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
      565              570              575
Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
      580              585              590
Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
      595              600              605
Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
      610              615              620
Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
  625              630              635              640
Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
      645              650              655
Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
      660              665              670
Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
      675              680              685

```


Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
 690 695 700

<210> 5

<211> 690

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> PEPTIT

<223> Trình tự protein của CEA khi cynomolgus được biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO (cynoCEA-CHO)

<400> 5

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

```

Pro Arg Asn Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val
 370                375                380
Ser Val Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro
385                390                395                400
Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu
                405                410                415
Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr
                420                425                430
Phe Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe
                435                440                445
Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala
                450                455                460
His Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr
465                470                475                480
Val Tyr Val Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn
                485                490                495
Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala
                500                505                510
Glu Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val
                515                520                525
Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu
                530                535                540
Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn
545                550                555                560
Ser Glu Ser Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr
                565                570                575
Gly Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser
                580                585                590
Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro
                595                600                605
Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val
                610                615                620
Leu Phe Ile Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys
625                630                635                640
Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn
                645                650                655
Ile Ser Val Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser
                660                665                670
Ala Arg Ala Thr Val Gly Ile Ile Ile Gly Met Leu Val Gly Val Ala
                675                680                685
Leu Met
        690

```

<210> 6

<211> 526

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> PEPTIT

<223> Trình tự protein của CEACAM1 người được biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO (CEACAM1-CHO)

<400> 6

```

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 1                5                10                15
Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
                20                25                30
Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
                35                40                45

```

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95
 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300
 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
 325 330 335
 Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
 340 345 350
 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365
 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
 370 375 380
 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400
 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415
 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 450 455 460
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
 465 470 475 480
 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 485 490 495
 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 500 505 510
 Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
 515 520 525

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb47

<400> 7
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Thr
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb47

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

<210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb63

<400> 9

```

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

```

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb63

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb67

<400> 11

```

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

```

```

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

```

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb67

```

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly
1      5      10      15
Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
      20      25      30
Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35      40      45
Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
      65      70      75      80
Pro Val Glu Gly Asp Asp Val Ala Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
      85      90      95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Met Glu Ile Lys
      100      105      110

```

<210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb103

```

<400> 13
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1      5      10      15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
      20      25      30
Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
      35      40      45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
      65      70      75      80

```

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

<210> 14
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb103

<400> 14
 Asp Leu Val Val Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
 35 40 45
 Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 100 105 110
 Thr Val Leu
 115

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự HCDR1 chuỗi nặng của mAb47

<400> 15
 Thr Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự HCDR2 chuỗi nặng của mAb47/mAb103

<400> 16
 Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

$\langle 210 \rangle$ 21

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

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự HCDR1 chuỗi nặng của mAb63

<400> 21
Asp Phe Tyr Met Asn
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự HCDR2 chuỗi nặng của mAb63

<400> 22
Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự HCDR3 chuỗi nặng của mAb63

<400> 23
Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự LCDR1 chuỗi nhẹ của mAb63

<400> 24
Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự LCDR2 chuỗi nhẹ của mAb63

<400> 25
Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự LCDR3 chuỗi nhẹ của mAb63

<400> 26
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự HCDR1 chuỗi nặng của mAb67

<400> 27
Asp Tyr His Met Asn
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự HCDR2 chuỗi nặng của mAb67

<400> 28
Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN

<223> Trình tự HCDR3 chuỗi nặng của mAb67

<400> 29

Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn
1 5

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự LCDR1 chuỗi nhẹ của mAb67

<400> 30

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile Gly Thr Asn Leu Ile His
1 5 10 15

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự LCDR2 chuỗi nhẹ của mAb67

<400> 31

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự LCDR3 chuỗi nhẹ của mAb67

<400> 32

Leu Gln Ser Arg Lys Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự HCDR1 chuỗi nặng của mAb103

<400> 33

Thr Tyr Gly Val Ile

1 5

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự HCDR3 chuỗi nặng của mAb103

<400> 34
Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự LCDR1 chuỗi nhẹ của mAb103

<400> 35
Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự LCDR2 chuỗi nhẹ của mAb103

<400> 36
Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
1 5 10

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự LCDR3 chuỗi nhẹ của mAb103

<400> 37
Gly Val Gly Asn Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
1 5 10

<210> 38
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự thể đột biến (D61S) HCDR2 chuỗi nặng của mAb47/mAb103

<400> 38

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

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h47VH1 của mAb47

<400> 39

Glu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys 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 Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h47VH2 của mAb47

<400> 40

Glu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

```

      50              55              60
Lys 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 Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100            105            110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115            120

```

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h47VH3 của mAb47

<400> 41

```

Glu 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 Thr Tyr
      20              25              30
Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
      35              40              45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50              55              60
Lys 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 Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100            105            110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115            120

```

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h47VH4 của mAb47

<400> 42

```

Glu 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 Thr Tyr
      20              25              30
Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
      35              40              45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
      50              55              60
Lys 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 Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h47VL1 của mAb47

<400> 43

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

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h47VL2 của mAb47

<400> 44

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

<210> 45
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h47VL3 của mAb47

<400> 45

```

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

```

<210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h47VL4 của mAb47

<400> 46

```

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

```

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự thể đột biến (N54S) HCDR2 chuỗi nặng của mAb63

<400> 47

```

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

```

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h63VH1 của mAb63

<400> 48

```

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

```

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h63VH2 của mAb63

<400> 49

```

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

```

```

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích
với người h63VH3 của mAb63

```

```

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

```

```

<210> 51
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích
với người h63VH4 của mAb63

```

```

<400> 51
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
      20              25              30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35              40              45
Gly Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
      50              55              60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65              70              75              80
Met Glu Phe Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100              105              110

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h63VH5 của mAb63

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h63VL1 của mAb63

<400> 53

```

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 Asn Ile Tyr
20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu 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 Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105

```

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h63VL2 của mAb63

<400> 54

```

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

```

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h63VL3 của mAb63

<400> 55

```

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

```

<210> 56

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h67VH1 của mAb67

<400> 56

```

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

```

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h67VH2 của mAb67

<400> 57

```

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

```

<210> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h67VH3 của mAb67

<400> 58

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

<210> 59

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h67VL1 của mAb67

<400> 59

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

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h67VL2 của mAb67

<400> 60

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
 20 25 30
 Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

```

      35          40          45
Arg Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ile Pro Ala
  50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
  65          70          75          80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
      85          90          95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100          105          110

```

<210> 61

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h67VL3 của mAb67

<400> 61

```

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

```

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h67VL4 của mAb67

<400> 62

```

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

```

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

<210> 63

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h67VL5 của mAb67

<400> 63

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

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự thể đột biến D56E) LCDR2 chuỗi nhẹ của mAb103

<400> 64

Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Glu
 1 5 10

<210> 65

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h103VH1 của mAb103

<400> 65

Glu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met


```

      35              40              45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
  50              55              60
Lys 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 Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
      100              105              110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 66

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h103VH2 của mAb103

<400> 66

```

Glu 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 Thr Tyr
      20              25              30
Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
      35              40              45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50              55              60
Lys 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 Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
      100              105              110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 67

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h103VH3 của mAb103

<400> 67

```

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

```

Lys 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 Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người h103VH4 của mAb103

<400> 68

Glu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
 50 55 60
 Lys 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 Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỄN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL1 của mAb103

<400> 69

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

```

      85          90          95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      100          105          110
Thr Val Leu
      115

```

<210> 70

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL2 của mAb103

<400> 70

```

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

```

<210> 71

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL3 của mAb103

<400> 71

```

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

```

Thr Val Leu
115

<210> 72
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL4 của mAb103

<400> 72
Glu Leu Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
35 40 45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu
115

<210> 73
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL5 của mAb103

<400> 73
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met
35 40 45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu
115

<210> 74
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL6 của mAb103

<400> 74
 Glu Leu Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met
 35 40 45
 Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu
 115

<210> 75
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL7 của mAb103

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

<210> 76
 <211> 115
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người h103VL8 của mAb103

<400> 76

```

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

```

<210> 77

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

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

<400> 77

```

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

```

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 78
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ của người

<400> 78
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 79
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> Trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ của người

<400> 79
 Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro

```

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

```

<210> 80

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nặng của Hu63-13

<400> 80

```

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

```



```
<210> 81
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<221> chuỗi
<223> Trình tự chuỗi nhẹ của Hu63-13
```

$\langle 210 \rangle$	82
$\langle 211 \rangle$	450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nặng của Hu47-14

<400> 82

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 83
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> chuỗi
 <223> Trình tự chuỗi nhẹ của Hu47-14

<400> 83
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 84
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> chuỗi
 <223> Trình tự chuỗi nặng của Hu67-14

<400> 84
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

```

      20      25      30
His Met Asn Trp Val Lys Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
      50      55      60
Lys Gly Lys Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100      105      110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
      115      120      125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
      130      135      140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
      145      150      155      160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
      165      170      175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
      180      185      190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
      195      200      205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
      210      215      220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
      225      230      235      240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
      245      250      255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
      260      265      270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
      275      280      285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
      290      295      300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
      305      310      315      320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
      325      330      335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      340      345      350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
      355      360      365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      370      375      380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
      385      390      395      400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
      405      410      415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      420      425      430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435      440      445

```

<210> 85

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nhẹ của Hu67-14

<400> 85

```

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

```

<210> 86

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nặng của Hu103-32

<400> 86

```

Glu 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 Thr Tyr
           20           25           30
Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
           50           55           60
Lys 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 Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala 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 Lys 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> 87

<211> 221

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nhẹ của Hu103-32

<400> 87

```

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

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65          70          75          80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn
          85          90          95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
          100         105         110
Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro
          115         120         125
Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
          130         135         140
Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
145          150          155          160
Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln
          165         170         175
Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
          180         185         190
Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
          195         200         205
Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
          210         215         220

```

<210> 88

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nặng của kháng thể Sanofi

<400> 88

```

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

```

```

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

```

<210> 89

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể Sanofi

<400> 89

```

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

```


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

<210> 90

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> chuỗi

<223> Trình tự chuỗi nặng của kháng thể Lmab

<400> 90

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

```

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

```

```

<210> 91
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> chuỗi
<223> Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể Lmab

```

```

<400> 91
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser
          20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45
Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65          70          75          80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
          85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
          100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
          115          120          125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
          130          135          140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
          145          150          155          160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
          165          170          175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
          180          185          190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
          195          200          205
Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

```

<210> 92
<211> 4

```

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Yếu tố liên kết TetraPEPTIT

<400> 92

Gly Gly Phe Gly

1

4