



(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)



1-0052655

(51)⁸ C12N 15/02; A61P 35/00; C07K 16/28; (13) B
C07K 16/32; C12P 21/08; C12N 1/19;
C12N 1/20; C12N 5/10; A61K 39/395;
C12N 1/15

(21) 1-2018-01651

(22) 23/09/2016

(86) PCT/JP2016/078067 23/09/2016

(87) WO 2017/051888 A1 30/03/2017

(30) 2015-187488 24/09/2015 JP

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/09/2018 366A

(73) Daiichi Sankyo Company, Limited (JP)

3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-8426, Japan

(72) SATOH, Kazuki (JP); HIRAHARA, Kazuki (JP); WATANABE, Ichiro (JP);
AMANO, Masato (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI GLYCOPROTEIN-A ƯU THỂ SAO
CHÉP (GARP), POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2018-01651

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)) mà liên kết với GARP và biểu hiện hoạt tính ức chế chức năng của Treg và biểu hiện hoạt tính ADCC. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa kháng thể nêu trên và được phẩm để sử dụng trong liệu pháp trị khối u, chứa kháng thể nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với GARP và hữu ích làm chất điều trị khối u, và phương pháp điều trị khối u bằng cách sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào T điều hòa (Treg) là tế bào nguyên nhân chính cảm ứng sự dung nạp miễn dịch được quan sát thấy ở vùng khối u của bệnh nhân ung thư. Tức là, ở bệnh nhân ung thư, các nhóm tế bào miễn dịch mà về bản chất có tác dụng tiêu diệt khối u bị chuyển sang trạng thái ức chế miễn dịch bởi Treg được hoạt hóa trong khối u này, và điều này dẫn đến sự tiến triển ác tính của khối u [Tài liệu phi sáng chế 1].

Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)) là protein có cấu trúc xuyên màng một lần [Tài liệu phi sáng chế 2], và protein này được biểu hiện trên bề mặt tế bào Treg và tạo phức chất với TGF- β tiềm tàng (một tiền chất của TGF- β là phân tử quan trọng để cảm ứng sự dung nạp miễn dịch) [Tài liệu phi sáng chế 3].

Do sự tương tác tế bào-tế bào giữa Treg và các tế bào đích mà Treg cảm ứng sự ức chế miễn dịch đến chúng, TGF- β được trưởng thành từ TGF- β tiềm tàng bởi GARP trên bề mặt tế bào Treg và được tiết ra từ Treg, và các tín hiệu ức chế miễn dịch của TGF- β được truyền trực tiếp đến các tế bào đích [Tài liệu phi sáng chế 4, 5]. Đã chứng minh được rằng GARP liên kết màng được biểu hiện trên bề mặt tế bào là cần thiết cho sự trưởng thành này của TGF- β [Tài liệu phi sáng chế 5]. Mặt khác, cũng đã chứng minh được rằng GARP hòa tan thiếu vùng xuyên màng ức chế sự tăng sinh của các tế bào T CD4-dương tính khi nó được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy tế bào [Tài liệu phi sáng chế 6]. Do đó, không thể loại trừ rằng có cơ chế ức chế miễn dịch của GARP mà không cần sự trưởng thành của TGF- β trên màng tế bào.

GARP không những được biểu hiện bởi Treg từ máu ngoại vi khi chúng được hoạt hóa, mà còn được biểu hiện trong môi trường lâm sàng bởi các tế bào thâm nhập khối u tại các vị trí khối u của bệnh nhân ung thư [Tài liệu phi sáng chế 7], bởi Treg

tồn tại trong các cổ trướng [Tài liệu phi sáng chế 8], và còn bởi Treg tuần hoàn trong máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư [Tài liệu phi sáng chế 9].

Trong thông báo nghiên cứu về tác dụng của việc ức chế sự biểu hiện GARP đến chức năng của Treg, GARP hướng đích siARN đã ức chế chức năng ức chế miễn dịch của Treg đối với các đáp ứng tăng sinh của các tế bào T giúp, song tác dụng ức chế này là một phần [Tài liệu phi sáng chế 10].

Trong thông báo khác, các kháng thể kháng GARP (MHG-8 và LHG-10) mà được ghi nhận là có khả năng ức chế sự trưởng thành TGF- β đã ức chế chức năng ức chế của các tế bào A1, là dòng tế bào Treg [Tài liệu phi sáng chế 11] xác lập được từ các bệnh nhân ứ đọng sắc tố sắt, đối với các đáp ứng tăng sinh của các tế bào T giúp [Tài liệu sáng chế 1 và Tài liệu phi sáng chế 12]. Tuy nhiên, không rõ các kháng thể nêu trên có hiệu quả biểu hiện các tác dụng ức chế như vậy đối với Treg trong môi trường khối u hay không, và đến nay, không có kháng thể kháng GARP nào có các tác dụng như vậy được thông báo. Một kháng thể nhận biết cả GARP lẫn TGF- β cũng được biết đến [Tài liệu sáng chế 2].

Đã chứng minh được rằng sự có mặt dư thừa và sự hoạt hóa Treg ở các bệnh nhân bị sốt rét và nhiễm HIV biểu hiện mối tương quan với tình trạng bệnh [Tài liệu phi sáng chế 13 và 14], và việc loại bỏ Treg dẫn đến thoái triển tình trạng bệnh trong mô hình chuột đối với các bệnh này [Tài liệu phi sáng chế 15 và 16].

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2015/015003

Tài liệu sáng chế 2: WO2016/125017

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Int J Cancer. 2010 Aug 15; 127(4): 759-67.

Tài liệu phi sáng chế 2: PLoS One. 2008; 3(7): e2705.

Tài liệu phi sáng chế 3: Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106(32): 13445-50.

Tài liệu phi sáng chế 4: Eur J Immunol. 2009; 39(12): 3315-22.

Tài liệu phi sáng chế 5: Mol Biol Cell. 2012; 23(6): 1129-39.

Tài liệu phi sáng chế 6: Blood. 2013; 122(7): 1182-91.

Tài liệu phi sáng chế 7: Eur J Immunol. 2012 Jul; 42(7): 1876-85.

Tài liệu phi sáng chế 8: Clin Immunol. 2013 Oct; 149(1): 97-110.

Tài liệu phi sáng chế 9: Cancer Res. 2013; 73: 2435.

Tài liệu phi sáng chế 10: Proc Natl Acad Sci USA. 2009 Aug 11; 106(32): 13445-50.

Tài liệu phi sáng chế 11: Eur J Immunol. 2009; 39(12): 869-82.

Tài liệu phi sáng chế 12: Sci Transl Med. 2015 Apr 22; 7(284)

Tài liệu phi sáng chế 13: PLoS One. 2008 Apr 30; 3(4): e2027.

Tài liệu phi sáng chế 14: Clin Exp Immunol. 2014 Jun; 176(3): 401-9.

Tài liệu phi sáng chế 15: J Immunol. 2012 Jun 1; 188(11): 5467-77.

Tài liệu phi sáng chế 16: PLoS Pathog. 2013; 9(12): e1003798.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể, kháng thể này ức chế chức năng của Treg trong khối u và theo đó được sử dụng làm dược phẩm có các tác dụng điều trị, phương pháp điều trị khối u bằng cách sử dụng kháng thể nêu trên, và kháng thể tương tự.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu hướng đến đạt được mục đích nêu trên. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra kháng thể liên kết đặc hiệu với GARP và biểu hiện hoạt tính ức chế chức năng của Treg qua tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC), theo đó tạo ra sáng chế. Cụ thể, sáng chế bao gồm các khía cạnh sau đây.

(1) Kháng thể có các đặc tính sau:

- (a) liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP));
- (b) có hoạt tính ức chế đối với chức năng ức chế miễn dịch của tế bào T điều hòa;
- (c) có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); và
- (d) có hoạt tính trị khối u in vivo.

(2) Kháng thể theo mục (1) ở trên, trong đó GARP là phân tử gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

(3) Kháng thể theo mục (1) hoặc (2) ở trên, trong đó kháng thể này liên kết với:

(a) phân trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 366 đến 377, 407 đến 445 và 456 đến 470 nêu trong SEQ ID NO: 1,

(b) phân trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 54 đến 112 và 366 đến 392 nêu trong SEQ ID NO: 1,

(c) phân trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 352 đến 392 nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc

(d) phân trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 18 đến 112 nêu trong SEQ ID NO: 1.

(4) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) ở trên, trong đó kháng thể này có hoạt tính ức chế cạnh tranh, đối với việc liên kết với GARP, so với kháng thể có:

(a) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3,

(b) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5,

(c) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27, hoặc

(d) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31.

(5) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) ở trên, trong đó khối u là bệnh ung thư.

(6) Kháng thể theo mục (5), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô niệu, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u nguyên bào đệm đa dạng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, hoặc bệnh ung thư máu.

(7) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6) ở trên, trong đó kháng thể này có:

(a) CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 26 đến 35 nêu trong SEQ ID NO: 2, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 50 đến 66 nêu

trong SEQ ID NO: 2 và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 99 đến 107 nêu trong SEQ ID NO: 2, và CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 23 đến 36 nêu trong SEQ ID NO: 3, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 52 đến 58 nêu trong SEQ ID NO: 3 và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 91 đến 101 nêu trong SEQ ID NO: 3,

(b) CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 26 đến 35 nêu trong SEQ ID NO: 4, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 50 đến 66 nêu trong SEQ ID NO: 4 và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 99 đến 112 nêu trong SEQ ID NO: 4, và CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 23 đến 36 nêu trong SEQ ID NO: 5, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 52 đến 58 nêu trong SEQ ID NO: 5 và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 91 đến 100 nêu trong SEQ ID NO: 5,

(c) CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 45 đến 54 nêu trong SEQ ID NO: 25, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 69 đến 78 nêu trong SEQ ID NO: 25 và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 118 đến 125 nêu trong SEQ ID NO: 25, và CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 44 đến 54 nêu trong SEQ ID NO: 27, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 70 đến 76 nêu trong SEQ ID NO: 27 và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 109 đến 117 nêu trong SEQ ID NO: 27, hoặc

(d) CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 45 đến 54 nêu trong SEQ ID NO: 29, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 69 đến 77 nêu trong SEQ ID NO: 29 và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 117 đến 128 nêu trong SEQ ID NO: 29, và CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 44 đến 54 nêu trong SEQ ID NO: 31, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 70 đến 76 nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 109 đến 117 nêu trong SEQ ID NO: 31.

(8) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7) ở trên, trong đó kháng thể này có:

- (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 1 đến 118 nêu trong SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 1 đến 112 nêu trong SEQ ID NO: 3,
- (b) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 1 đến 123 nêu trong SEQ ID NO: 4, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 1 đến 111 nêu trong SEQ ID NO: 5,
- (c) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 25, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 27, hoặc
- (d) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 139 nêu trong SEQ ID NO: 29, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 31.
- (9) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8) ở trên, trong đó vùng ổn định là vùng ổn định được tạo ra từ người.
- (10) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9) ở trên, trong đó kháng thể này có:
- (a) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3,
- (b) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5,
- (c) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 25, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 27, hoặc
- (d) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 469 nêu trong SEQ ID NO: 29, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 31.
- (11) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (10) ở trên, trong đó kháng thể này được nhân hóa.
- (12) Kháng thể theo mục (11), trong đó kháng thể này có:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33,
- (b) trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 35,
- (c) trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 139 nêu trong SEQ ID NO: 41,
- (d) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (a) đến (c), và
- (e) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (a) đến (c), và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

- (f) trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37,
- (g) trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 39,
- (h) trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 43,
- (i) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (f) đến (h), và
- (j) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (f) đến (h).

(13) Kháng thể theo mục (11) hoặc (12), trong đó kháng thể này có:

- (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37,
- (b) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 35, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 39, hoặc
- (c) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 139 nêu trong SEQ ID NO: 41, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 43.

(14) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (11) đến (13), trong đó kháng thể này có:

(a) chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 33, chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 35, và chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 469 nêu trong SEQ ID NO: 41, và

(b) chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 37, chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 39, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 43.

(15) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (11) đến (14), trong đó kháng thể này có:

(a) chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 33, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 37,

(b) chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 35, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 39, hoặc

(c) chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 469 nêu trong SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 43.

(16) Polynucleotit mã hóa kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (15).

(17) Polynucleotit theo mục (16), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit CDRH1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 76 đến 105 nêu trong SEQ ID NO: 6, polynucleotit CDRH2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 148 đến 198 nêu trong SEQ ID NO: 6 và polynucleotit CDRH3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 295 đến 321 nêu trong SEQ ID NO: 6, và

polynucleotit CDRL1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 67 đến 108 nêu trong SEQ ID NO: 7, polynucleotit CDRL2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 154 đến 174 nêu trong SEQ ID NO: 7 và polynucleotit CDRL3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 271 đến 303 nêu trong SEQ ID NO: 7,

(b) polynucleotit mã hóa CDRH1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 76 đến 105 nêu trong SEQ ID NO: 8, polynucleotit CDRH2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 148 đến 198 nêu trong SEQ ID NO: 8 và polynucleotit CDRH3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 295 đến 336 nêu trong SEQ ID NO: 8, và polynucleotit CDRL1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 67 đến 108 nêu trong SEQ ID NO: 9, polynucleotit CDRL2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 154 đến 174 nêu trong SEQ ID NO: 9 và polynucleotit CDRL3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 271 đến 300 nêu trong SEQ ID NO: 9,

(c) polynucleotit CDRH1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 133 đến 162 nêu trong SEQ ID NO: 24, polynucleotit CDRH2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 205 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 24 và polynucleotit CDRH3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 352 đến 375 nêu trong SEQ ID NO: 24, và polynucleotit CDRL1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 nêu trong SEQ ID NO: 26, polynucleotit CDRL2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 208 đến 228 nêu trong SEQ ID NO: 26 và polynucleotit CDRL3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 325 đến 351 nêu trong SEQ ID NO: 26, hoặc

(d) polynucleotit CDRH1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 133 đến 162 nêu trong SEQ ID NO: 28, polynucleotit CDRH2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 205 đến 231 nêu trong SEQ ID NO: 28 và polynucleotit CDRH3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 349 đến 384 nêu trong SEQ ID NO: 28, và polynucleotit CDRL1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 nêu trong SEQ ID NO: 30, polynucleotit CDRL2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 208 đến 228 nêu trong SEQ ID NO: 30 và polynucleotit CDRL3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 325 đến 351 nêu trong SEQ ID NO: 30.

(18) Polynucleotit theo mục (16) hoặc (17), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 354 nêu trong SEQ ID NO: 6, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 336 nêu trong SEQ ID NO: 7,

(b) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 369 nêu trong SEQ ID NO: 8, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 333 nêu trong SEQ ID NO: 9,

(c) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 24, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 26, hoặc

(d) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 417 nêu trong SEQ ID NO: 28, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 30.

(19) Polynucleotit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (16) đến (18), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7,

(b) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9,

(c) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 24, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 26, hoặc

(d) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1407 nêu trong SEQ ID NO: 28, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 30.

(20) Polynucleotit theo mục (16) hoặc (17), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 32, polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ

ID NO: 34, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 417 nêu trong SEQ ID NO: 40, và

(b) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 36, polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 38, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 42.

(21) Polynucleotit theo mục (16), (17) hoặc (20), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 32, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 36,

(b) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 34, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 38, hoặc

(c) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 417 nêu trong SEQ ID NO: 40, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 42.

(22) Polynucleotit theo mục (16), (17), (20) hoặc (21), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 32, polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 34, và polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1407 nêu trong SEQ ID NO: 40, và

(b) polynucleotit của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 36, polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến

702 nêu trong SEQ ID NO: 38, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 42.

(23) Polynucleotit theo mục bất kỳ trong số các mục từ trong số các mục (16), (17) và từ (20) đến (22), trong đó polynucleotit này có:

(a) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 32, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 36,

(b) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 34, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 38, hoặc

(c) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1407 nêu trong SEQ ID NO: 40, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 42.

(24) Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (16) đến (23).

(25) Tế bào chủ được biến nạp vector biểu hiện theo mục (24).

(26) Phương pháp sản xuất kháng thể nghiên cứu hoặc đoạn của nó, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo mục (25), và bước thu kháng thể nghiên cứu từ môi trường nuôi cấy thu được bởi bước nêu trên.

(27) Kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất theo mục (26).

(28) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (15) và (27), trong đó kháng thể này bao gồm một hoặc hai hoặc nhiều cải biến được chọn từ nhóm bao gồm glycosyl hóa liên kết với N, glycosyl hóa liên kết với O, xử lý đầu tận cùng N, xử lý đầu tận cùng C, loại amin, đồng phân hóa axit aspartic, oxy hóa methionin, thêm gốc methionin vào đầu tận cùng N, amit hóa gốc prolin, và chuỗi nặng bao gồm đoạn khuyết gồm một hoặc hai axit amin ở đầu tận cùng carboxyl.

(29) Kháng thể theo mục (28), trong đó một hoặc hai axit amin bị khuyết đoạn ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của nó.

(30) Kháng thể theo mục (29), trong đó một axit amin bị khuyết đoạn ở mỗi đầu tận cùng carboxyl của cả hai chuỗi nặng của nó.

- (31) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (30), trong đó gốc prolin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của nó tiếp tục được amit hóa.
- (32) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (15) và từ (27) đến (31), trong đó cải biến mạch đường được điều hòa để tăng cường tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.
- (33) Dược phẩm chứa ít nhất một trong số các kháng thể theo mục từ (1) đến (15) và từ (27) đến (32).
- (34) Dược phẩm theo mục (33), trong đó dược phẩm này là để sử dụng trong liệu pháp trị khối u.
- (35) Dược phẩm theo mục (34), trong đó khối u là bệnh ung thư.
- (36) Dược phẩm theo mục (35), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô niệu, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u nguyên bào đệm đa dạng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, hoặc bệnh ung thư máu.
- (37) Phương pháp điều trị khối u, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng ít nhất một trong số các kháng thể theo mục (1) đến (15) và từ (27) đến (32) cho cá thể.
- (38) Phương pháp điều trị theo mục (37), trong đó khối u là bệnh ung thư.
- (39) Phương pháp điều trị theo mục (38), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô niệu, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u nguyên bào đệm đa dạng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, hoặc bệnh ung thư máu.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, có thể thu được chất điều trị đối với bệnh ung thư bao gồm kháng thể liên kết với GARP và có hoạt tính trị khối u do việc ức chế Treg qua trung gian ADCC. Ngoài ra, sự có mặt dư thừa Treg và sự hoạt hóa nó ở các bệnh nhân bị bệnh sốt rét và nhiễm HIV biểu hiện mối tương quan với tình trạng bệnh, và việc loại bỏ Treg cảm ứng sự thoái triển mỗi bệnh trong mô hình chuột đối với các bệnh này.

Do đó, tin rằng việc ức chế hữu hiệu chức năng Treg cũng có các tác dụng điều trị đối với các bệnh nhiễm khó chữa như bệnh sốt rét và HIV.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của GARP.

Fig.2 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 2) của chuỗi nặng kháng thể 105F.

Fig.3 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 3) của chuỗi nhẹ kháng thể 105F.

Fig.4 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 4) của chuỗi nặng kháng thể 110F.

Fig.5 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 5) của chuỗi nhẹ kháng thể 110F.

Fig.6 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 6) của chuỗi nặng kháng thể 105F.

Fig.7 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 7) của chuỗi nhẹ kháng thể 105F.

Fig.8 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 8) của chuỗi nặng kháng thể 110F.

Fig.9 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 9) của chuỗi nhẹ kháng thể 110F.

Fig.10 thể hiện sự liên kết của kháng thể với GARP. Kháng thể 105F và kháng thể 110F thể hiện sự liên kết của nó với GARP theo phương pháp ELISA.

Fig.11 thể hiện sự liên kết đặc hiệu của kháng thể với GARP. Kháng thể 105F không liên kết với tế bào HEK293T, mà trong tế bào này vector trống đã được đưa vào, và biểu hiện sự liên kết của nó với tế bào HEK293T, trong đó GARP đã được biểu hiện tạm thời.

Fig.12 thể hiện sự liên kết đặc hiệu của kháng thể với GARP. Kháng thể 105F thể hiện hoạt tính liên kết với tế bào L428 có biểu hiện nội sinh GARP.

Fig.13 thể hiện sự liên kết đặc hiệu của kháng thể với GARP. Kháng thể 105F thể hiện hoạt tính liên kết với Treg đã hoạt hóa.

Fig.14 thể hiện hoạt tính ADCC của kháng thể. Khi tế bào L428 biểu hiện nội sinh GARP được dùng làm đích, sự gia tăng hoạt tính ADCC được phát hiện theo cách phụ thuộc nồng độ kháng thể 105F.

Fig.15 thể hiện hoạt tính ức chế của kháng thể đối với chức năng Treg. Kháng thể 105F (50 µg/mL) đã ức chế hoạt tính ức chế tăng sinh của Treg chống tế bào T giúp.

Fig.16 thể hiện hoạt tính ức chế của kháng thể đối với chức năng Treg. Kháng thể 105F (10 µg/mL) đã ức chế hoạt tính ức chế tăng sinh của Treg chống tế bào T giúp. Mặt khác, các kháng thể MHG-8 và LHG-10 không biểu hiện tác dụng đối với chức năng ức chế tăng sinh của Treg chống tế bào T giúp.

Fig.17 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 25) của chuỗi nặng kháng thể c151D.

Fig.18 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 27) của chuỗi nhẹ kháng thể c151D.

Fig.19 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 29) của chuỗi nặng kháng thể c198D.

Fig.20 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 31) của chuỗi nhẹ kháng thể c198D.

Fig.21 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 33) của chuỗi nặng h151D-H1.

Fig.22 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 37) của chuỗi nhẹ h151D-L1.

Fig.23 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 35) của chuỗi nặng h151D-H4.

Fig.24 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 39) của chuỗi nhẹ h151D-L4.

Fig.25 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 41) của chuỗi nặng h198D-H3.

Fig.26 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 43) của chuỗi nhẹ h198D-L4.

Fig.27 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 24) của chuỗi nặng kháng thể c151D.

Fig.28 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 26) của chuỗi nhẹ kháng thể c151D.

Fig.29 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 28) của chuỗi nặng kháng thể c198D.

Fig.30 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 30) của chuỗi nhẹ kháng thể c198D.

Fig.31 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 32) của chuỗi nặng kháng thể h151D-H1.

Fig.32 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 36) của chuỗi nặng kháng thể h151D-L1.

Fig.33 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 34) của chuỗi nặng h151D-H4.

Fig.34 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 38) của chuỗi nhẹ h151D-L4.

Fig.35 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 40) của chuỗi nặng h198D-H3.

Fig.36 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 42) của chuỗi nhẹ h198D-L4.

Fig.37 thể hiện hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể với tế bào biểu hiện GARP. h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính liên kết đặc hiệu với GARP.

Fig.38 thể hiện hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể với tế bào biểu hiện đồng thời GARP-TGF β 1. Các kháng thể riêng rẽ 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 liên kết với cả GARP và thể đột biến GARP, hai protein này được biểu hiện đồng thời với TGF β 1, và các kháng thể này biểu hiện hoạt tính liên kết với vùng khác nhau trong GARP so với trường hợp của các kháng thể đã biết MHG8 và LHG10.

Fig.39 thể hiện hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể với tế bào L428. Các kháng thể riêng rẽ h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính liên kết với GARP được biểu hiện nội sinh.

Fig.40 thể hiện hoạt tính liên kết của mỗi kháng thể với Treg. Các kháng thể riêng rẽ h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính liên kết với Treg dương tính với FoxP3.

Fig.41 thể hiện hoạt tính ADCC của mỗi kháng thể. Các kháng thể riêng rẽ h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính ADCC.

Fig.42 thể hiện hoạt tính ức chế của mỗi kháng thể đối với chức năng Treg. Các kháng thể riêng rẽ h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính ức chế chức năng Treg.

Fig.43 thể hiện hoạt tính ức chế của Treg đối với hoạt tính làm tan tế bào đích của CTL.

Fig.44 thể hiện sự gia tăng hoạt tính trị khối u của mỗi kháng thể. Các kháng thể riêng rẽ 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4, và h198D-H3L4 ức chế chức năng ức chế của Treg đối với hoạt tính làm tan tế bào của CTL.

Fig.45 thể hiện hoạt tính trị khối u *in vivo* của mỗi kháng thể. Các kháng thể riêng rẽ 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4, và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính trị khối u trong các mô hình *in vivo*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh ung thư" được sử dụng với nghĩa giống như nghĩa của "khối u".

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gen" được sử dụng bao gồm, không chỉ ADN mà còn là mRNA và cADN, và cARN của nó.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polynucleotit" được sử dụng với nghĩa giống như nghĩa của axit nucleic, và nó bao gồm ADN, ARN, đoạn dò, oligonucleotit, và môi.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit" được sử dụng sao cho nó không khác biệt so với thuật ngữ "protein".

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào" bao gồm các tế bào trong động vật cụ thể, và các tế bào nuôi cấy.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "GARP" được sử dụng với nghĩa giống như nghĩa của protein GARP.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tính gây độc tế bào" được dùng để chỉ sự thay đổi bệnh lý gây ra cho các tế bào theo cách xác định bất kỳ. Nó không chỉ có nghĩa là chấn thương trực tiếp, mà còn có nghĩa là tất cả các loại tổn thương cấu trúc hoặc chức năng gây ra cho các tế bào, như cắt ADN, tạo dime bazơ, cắt nhiễm sắc thể, làm tổn thương bộ máy nguyên phân tế bào, và làm giảm hoạt tính của các loại enzym.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoạt tính gây độc tế bào" được sử dụng để chỉ hoạt tính gây ra tính gây độc tế bào được mô tả ở trên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể" được dùng để chỉ "hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent

cellular cytotoxic: ADCC)" và hoạt tính này có nghĩa là tác dụng hoặc hoạt tính làm tổn thương tế bào đích như tế bào khối u bởi các tế bào NK qua trung gian kháng thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ cấu trúc peptit riêng phần hoặc cấu trúc ba chiều riêng phần của GARP, mà kháng thể kháng GARP đặc hiệu liên kết với chúng. Epitop như vậy, là peptit riêng phần của GARP được mô tả ở trên, có thể được xác định bằng phương pháp được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, như thử nghiệm miễn dịch, ví dụ, bằng phương pháp sau. Trước tiên, các cấu trúc riêng phần của kháng nguyên được sản xuất. Để sản xuất các cấu trúc riêng phần này, kỹ thuật tổng hợp oligopeptit đã biết có thể được áp dụng. Ví dụ, loạt peptit, trong đó kháng nguyên đã được cắt ngắn thành công tới độ dài thích hợp từ đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N của nó, được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, và sau đó, khả năng phản ứng của các polypeptit này được nghiên cứu, và các vị trí nhận biết là hầu như được xác định. Sau đó, các peptit ngắn hơn nữa được tổng hợp, và tiếp theo khả năng phản ứng của chúng với các peptit nêu trên được nghiên cứu, để xác định epitop. Hơn nữa, epitop, là cấu trúc ba chiều riêng phần của kháng nguyên liên kết với kháng thể đặc hiệu, có thể được xác định bằng cách xác định các gốc axit amin của kháng nguyên liên kết kháng thể được mô tả ở trên bằng phân tích cấu trúc tia X.

Trong bản mô tả này, cụm từ "kháng thể liên kết với cùng epitop" dùng để chỉ các kháng thể khác nhau liên kết với epitop chung. Nếu kháng thể thứ hai liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc ba chiều riêng phần, mà kháng thể thứ nhất liên kết với chúng, có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng epitop. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất về sự liên kết của kháng thể thứ nhất với kháng nguyên (tức là, kháng thể thứ hai ngăn cản sự liên kết của kháng thể thứ nhất với kháng nguyên), có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng epitop, ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc đặc hiệu của epitop chưa được xác định. Ngoài ra, khi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng epitop và ngoài ra, kháng thể thứ nhất có các tác dụng đặc hiệu như hoạt tính trị khối u, kháng thể thứ hai có thể được tin là có hoạt tính giống như hoạt tính của kháng thể thứ nhất. Do đó,

nếu kháng thể kháng GARP thứ hai liên kết với peptit riêng phần mà kháng thể kháng GARP thứ nhất liên kết với nó, thì có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng epitop của GARP. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể kháng GARP thứ hai cạnh tranh với kháng thể kháng GARP thứ nhất về sự liên kết của kháng thể kháng GARP thứ nhất với GARP, có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai là các kháng thể liên kết với cùng epitop của GARP.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "CDR" được dùng để chỉ vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region). Biết rằng mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có ba CDR. CDR này còn được gọi là vùng siêu biến, và được định vị trong vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Các vùng này có cấu trúc biến đổi đặc biệt cao và được tách thành ba vùng trên cấu trúc bậc một của chuỗi polypeptit trong mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong bản mô tả này, liên quan đến CDR của kháng thể, các CDR của chuỗi nặng lần lượt được ký hiệu là CDRH1, CDRH2 và CDRH3, từ phía đầu tận cùng amino của trình tự axit amin của chuỗi nặng, trong khi các CDR của chuỗi nhẹ lần lượt được ký hiệu là CDRL1, CDRL2 và CDRL3, từ phía đầu tận cùng amino của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ. Các vị trí này nằm gần nhau trên cấu trúc ba chiều, và xác định tính đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên, phần tử mà kháng thể sẽ liên kết với nó.

Theo sáng chế, cụm từ "lai trong các điều kiện nghiêm ngặt" được dùng để chỉ việc lai đó được thực hiện trong dung dịch có bán trên thị trường ExpressHyb Hybridization Solution (do Clontech sản xuất) ở 68°C, hoặc việc lai được thực hiện trong các điều kiện trong đó việc lai được thực hiện bằng cách sử dụng bộ lọc cố định ADN với sự có mặt của 0,7-1,0 M NaCl ở 68°C, và tiếp theo sản phẩm thu được được rửa ở 68°C với dung dịch SSC có nồng độ 0,1- đến 2 lần (trong đó 1 x SSC gồm có 150mM NaCl và 15mM natri xitrat) cho việc nhận dạng, hoặc các điều kiện tương đương với nó.

1. GARP

GARP được sử dụng theo sáng chế có thể được tinh chế trực tiếp từ các tế bào biểu hiện GARP của người hoặc động vật có vú không phải người (ví dụ, chuột cống,

chuột nhắt, v.v.) và tiếp theo có thể được sử dụng, hoặc phần màng tế bào của các tế bào nêu trên có thể được điều chế và có thể được sử dụng làm GARP. Theo cách khác, GARP cũng có thể được thu bằng cách tổng hợp nó *in vitro*, hoặc bằng cách cho tế bào chủ sản xuất GARP bằng thao tác di truyền. Theo thao tác di truyền này, protein GARP có thể được thu, cụ thể, bằng cách hợp nhất GARP cADN vào vector biểu hiện có khả năng biểu hiện GARP cADN, và tiếp theo tổng hợp GARP trong dung dịch chứa các enzym, cơ chất và các hoạt chất cần cho việc phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biến nạp tế bào chủ của các sinh vật không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình khác, để chúng biểu hiện GARP.

Trình tự axit amin của GARP người được nêu trong SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 1 được thể hiện trên Fig.1.

Hơn nữa, một protein, gồm có trình tự axit amin chứa đoạn thay thế, đoạn khuyết và/hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự axit amin nêu trên của GARP, và có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của protein GARP, cũng được bao gồm trong GARP.

GARP người trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, tương ứng với trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 662 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, một protein, gồm có trình tự axit amin chứa đoạn thay thế, đoạn khuyết và/hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, và có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của protein GARP, cũng được bao gồm trong GARP. Ngoài ra, một protein, gồm có trình tự axit amin được mã hóa bởi biến thể ghép được phiên mã từ locut gen GARP người hoặc trình tự axit amin chứa đoạn thay thế, đoạn khuyết và/hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự axit amin nêu trên, và có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của protein GARP, cũng được bao gồm trong GARP.

2. Sản xuất kháng thể kháng GARP

Ví dụ về kháng thể kháng GARP theo sáng chế có thể là kháng thể người kháng GARP. Kháng thể người kháng GARP có nghĩa là kháng thể người chỉ có trình tự gen của kháng thể được tạo ra từ nhiễm sắc thể người.

Kháng thể người kháng GARP có thể được thu bằng phương pháp sử dụng chuột sản xuất kháng thể người có đoạn nhiễm sắc thể người bao gồm các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người (xem Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, p. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. và Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, p. 722-727; v.v.).

Chuột sản xuất kháng thể như vậy có thể được sản xuất đặc hiệu bằng cách sử dụng động vật cải biến gen, locut gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch nội sinh đã được phá vỡ và thay vào đó locut gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của người đã được đưa vào bằng cách sử dụng vectơ nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (yeast artificial chromosome: YAC) hoặc vectơ tương tự, và tiếp theo sản xuất động vật khuyết di truyền và động vật chuyển gen từ động vật biến đổi gen này, và tiếp theo cho các động vật này lai với nhau.

Theo cách khác, kháng thể người kháng GARP cũng có thể được thu bằng cách biến nạp tế bào có nhân điển hình bằng cADN mã hóa mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người này, hoặc tốt hơn là bằng vectơ chứa cADN này, theo kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, và tiếp theo nuôi cấy tế bào đã biến nạp sản xuất kháng thể đơn dòng biến đổi gen, để kháng thể này có thể được thu từ dịch nổi nuôi cấy. Về tế bào chủ, tế bào có nhân điển hình, và tốt hơn là, tế bào động vật có vú như tế bào CHO, tế bào lympho hoặc u hắc sắc tố, ví dụ, có thể được sử dụng.

Theo cách khác, kháng thể cũng có thể được thu bằng phương pháp thu kháng thể người được tạo ra từ việc biểu hiện thể thực khuẩn được chọn từ ngân hàng kháng thể người (xem Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), p. 427-431; v.v.). Ví dụ, phương pháp biểu hiện thể

thực khuẩn, bao gồm cho vùng biến đổi của kháng thể người biểu hiện dưới dạng kháng thể chuỗi đơn (single chain antibody: scFv) trên bề mặt của thể thực khuẩn, và tiếp theo chọn thể thực khuẩn liên kết với kháng nguyên, có thể được áp dụng (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116).

Bằng cách phân tích gen thể thực khuẩn đã được chọn nhờ khả năng liên kết của nó với kháng nguyên, trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể người liên kết với kháng nguyên có thể được xác định. Khi trình tự ADN của scFv liên kết với kháng nguyên được xác định, trình tự ADN của vùng ổn định của kháng thể được cho liên kết với nó để tạo ra vector biểu hiện IgG có các trình tự nêu trên, và tiếp theo vector biểu hiện sản xuất được này được đưa vào tế bào chủ thích hợp và cho biểu hiện trong đó, theo đó thu được kháng thể người (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105-1116).

Hơn nữa, kháng thể kháng GARP theo sáng chế có thể được thu bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng GARP hoặc polypeptit xác định bất kỳ được chọn từ trình tự axit amin của GARP, và tiếp theo thu và tinh chế kháng thể được sản xuất trong cơ thể sống đó. Loài sinh vật mang GARP dùng làm kháng nguyên không được giới hạn ở người, và do đó, động vật cũng có thể được gây miễn dịch bằng GARP được tạo ra từ động vật không phải người, như chuột nhắt hoặc chuột cống. Trong trường hợp này, kháng thể có thể áp dụng cho bệnh của người có thể được chọn bằng cách kiểm tra khả năng phản ứng chéo của kháng thể thu được liên kết với GARP khác loại với GARP của người.

Ngoài ra, các tế bào sản xuất kháng thể mà sản xuất kháng thể kháng GARP sẽ được dung hợp với tế bào u tủy theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) để thiết lập tế bào lai, để thu được kháng thể đơn dòng.

Cần lưu ý rằng GARP dùng làm kháng nguyên có thể được thu bằng cách cho tế bào chủ sản xuất gen GARP theo thao tác di truyền.

Cụ thể, vector có khả năng biểu hiện gen GARP được sản xuất, và tiếp theo vector này được đưa vào tế bào chủ, để gen này được biểu hiện trong đó, và sau đó,

GARP đã biểu hiện được tinh chế. Sau đây, phương pháp thu kháng thể kháng GARP sẽ được mô tả cụ thể.

(1) Điều chế kháng nguyên

Ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng GARP có thể bao gồm GARP, polypeptit gồm có ít nhất 6 trình tự axit amin riêng phần liên ứng của nó, và dẫn xuất điều chế được bằng cách thêm trình tự axit amin xác định bất kỳ hoặc chất mang vào GARP này hoặc polypeptit của nó.

GARP có thể được tinh chế trực tiếp từ các mô khối u hoặc tế bào khối u của người và tiếp theo có thể được sử dụng. Theo cách khác, GARP cũng có thể được thu bằng cách tổng hợp nó *in vitro* hoặc bằng cách cho tế bào chủ sản xuất nó theo thao tác di truyền.

Theo thao tác di truyền này, kháng nguyên có thể được thu, cụ thể, bằng cách hợp nhất cADN mã hóa GARP vào vector biểu hiện có khả năng biểu hiện cADN mã hóa GARP, và tiếp theo tổng hợp GARP trong dung dịch chứa enzym, cơ chất và các hoạt chất cần cho việc phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biến nạp tế bào chủ của các sinh vật không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình khác, để chúng biểu hiện GARP.

Cũng có thể thu được kháng nguyên dưới dạng protein bài tiết bằng cách cho phép protein dung hợp, được tạo ra bằng cách gắn ADN mã hóa vùng ngoại bào của GARP dưới dạng protein màng với ADN mã hóa vùng ổn định của kháng thể, biểu hiện trong hệ tế bào chủ và/hoặc vector thích hợp.

GARP cADN có thể được thu bằng phương pháp PCR, bao gồm thực hiện phản ứng chuỗi nhờ polymeraza (polymerase chain reaction, sau đây gọi là "PCR"), ví dụ, bằng cách sử dụng ngân hàng cADN biểu hiện cADN của GARP làm khuôn, và cũng sử dụng các môi khuếch đại đặc hiệu GARP cADN (xem Saiki, R. K., et al. Science (1988) 239, p. 487-489).

Ví dụ về tổng hợp polypeptit *in vitro* có thể là Rapid Translation System (RTS) do Roche Diagnostics sản xuất, song không hạn chế ở đó.

Ví dụ về tế bào không có nhân điển hình dùng làm tế bào chủ có thể bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp tế bào chủ bằng gen nghiên cứu, tế

bào chủ này được biến nạp bằng vector plasmit chứa sản phẩm sao chép được tạo ra từ các loài tương thích với tế bào chủ, tức là, điểm khởi đầu sao chép, và trình tự điều hòa. Về vector, vector có trình tự có khả năng truyền tính chọn lọc kiểu hình cho tế bào cần biến nạp là được ưu tiên.

Ví dụ về tế bào có nhân điển hình dùng làm tế bào chủ có thể bao gồm các tế bào của động vật có xương sống, côn trùng và nấm men. Ví dụ về tế bào động vật có xương sống thường được sử dụng bao gồm tế bào COS là tế bào khỉ (Gluzman, Y., Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi chuột nhắt NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và dòng tế bào khuyết dihydrofolat reductaza của tế bào trứng chuột túi má Trung Quốc (tế bào CHO, ATCC CCL-61) (Urlaub, G. và Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, p. 4126-4220), song không giới hạn ở đó.

Thế biến nạp thu được theo cách này có thể được nuôi cấy theo các phương pháp thông thường, và polypeptit nghiên cứu có thể được sản xuất bên trong hoặc bên ngoài tế bào nuôi cấy.

Về môi trường được sử dụng trong nuôi cấy, nhiều loại môi trường được sử dụng phổ biến có thể được chọn, nếu thích hợp, tùy theo loại tế bào chủ được nuôi. Nếu tế bào chủ là *Escherichia coli*, ví dụ, chất kháng sinh như ampicillin hoặc IPMG có thể được thêm vào môi trường LB, nếu cần, và tiếp theo môi trường thu được có thể được sử dụng.

Protein tái tổ hợp được sản xuất bên trong hoặc bên ngoài tế bào biến nạp nhờ quá trình nuôi cấy được mô tả ở trên có thể được tách và/hoặc tinh chế bằng các phương pháp đã biết, bằng cách sử dụng các đặc tính vật lý hoặc các đặc tính hóa học của protein.

Ví dụ cụ thể về phương pháp này có thể bao gồm xử lý bằng cách sử dụng chất làm kết tủa protein thông thường, siêu lọc, các loại sắc ký lỏng như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp thụ, sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký ái lực, phương pháp thẩm tách, và kết hợp các phương pháp này.

Ngoài ra, bằng cách gắn đuôi histidin gồm có 6 vào protein tái tổ hợp cần biểu hiện, protein này có thể được tinh chế một cách hữu hiệu bằng cách sử dụng cột ái lực

niken. Theo cách khác, bằng cách nối vùng Fc của IgG với protein tái tổ hợp cần biểu hiện, protein này có thể được tinh chế một cách hữu hiệu bằng cách sử dụng cột Protein A.

Bằng cách kết hợp các phương pháp đã mô tả ở trên với nhau, polypeptit nghiên cứu có thể được sản xuất ở quy mô lớn, với năng suất cao và với độ tinh khiết cao.

(2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng GARP

Ví dụ về kháng thể liên kết đặc hiệu với GARP có thể là kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với GARP. Phương pháp thu kháng thể đơn dòng này là như sau.

Để sản xuất kháng thể đơn dòng, các bước xử lý sau nói chung là cần thiết.

Cụ thể, các bước xử lý cần thiết bao gồm:

- (a) tinh chế polyme sinh học dùng làm kháng nguyên,
- (b) bước gây miễn dịch động vật bằng kháng nguyên bằng cách tiêm, lấy máu từ động vật, kiểm tra hiệu giá kháng thể để xác định giai đoạn cắt xén lách ra khỏi động vật, và tiếp theo điều chế tế bào sản xuất kháng thể,
- (c) điều chế tế bào u tủy (sau đây gọi là "u tủy"),
- (d) dung hợp tế bào giữa tế bào sản xuất kháng thể và u tủy,
- (e) chọn nhóm u tủy sản xuất kháng thể nghiên cứu,
- (f) phân chia thành các dòng tế bào đơn (nhân dòng vô tính),
- (g) tùy ý, nuôi cấy tế bào lai để sản xuất hàng loạt kháng thể đơn dòng, hoặc lai giống các động vật mà trong đó tế bào lai đã được cấy, và
- (h) phân tích hoạt tính sinh lý và tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng sản xuất được theo cách này, hoặc kiểm tra các đặc tính của kháng thể dưới dạng thuốc thử đánh dấu.

Sau đây, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết cùng với các bước đã mô tả ở trên. Tuy nhiên, phương pháp sản xuất kháng thể nêu trên là không được giới hạn ở đó, và, ví dụ, tế bào sản xuất kháng thể không phải tế bào lách và u tủy cũng có thể được sử dụng.

(a) Tinh chế kháng nguyên

Về kháng nguyên, GARP điều chế được bằng phương pháp được mô tả ở trên, hoặc một phần của nó, có thể được sử dụng.

Theo cách khác, phần màng điều chế được từ các tế bào soma tái tổ hợp biểu hiện GARP, hoặc chính các tế bào soma tái tổ hợp biểu hiện GARP, hoặc ngoài ra, peptit riêng phần của protein theo sáng chế, được tổng hợp hóa học theo phương pháp được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, cũng có thể được dùng làm kháng nguyên.

(b) Điều chế tế bào sản xuất kháng thể

Kháng nguyên thu được ở bước (a) được trộn với chất phụ trợ, như tá được Freund đầy đủ hoặc không đầy đủ, hoặc phèn kali, để tạo ra chất gây miễn dịch, và sau đó, động vật thí nghiệm được gây miễn dịch bằng chất gây miễn dịch. Về động vật thí nghiệm này, động vật được sử dụng trong các phương pháp đã biết để sản xuất tế bào lai có thể được sử dụng mà không có vấn đề gì. Ví dụ cụ thể về động vật như vậy mà có thể được sử dụng ở đây bao gồm chuột nhắt, chuột cống, dê, cừu, bò, và ngựa. Từ quan điểm độ khả dụng của tế bào u tủy cần dung hợp với tế bào sản xuất kháng thể cắt xén, v.v., chuột nhắt hoặc chuột cống tốt hơn là được sử dụng làm động vật để gây miễn dịch.

Các chủng chuột nhắt và chuột cống được sử dụng thực tế là không được giới hạn cụ thể. Trong trường hợp của chuột nhắt, ví dụ về chủng mà có thể được sử dụng ở đây bao gồm A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, và 129. Mặt khác, trong trường hợp của chuột cống, ví dụ về chủng mà có thể được sử dụng ở đây bao gồm Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN, và Fischer.

Các chuột nhắt và chuột cống này là có thể sử dụng được từ các nhà nhân giống và phân phối động vật thí nghiệm, như CLEA Japan, Inc. và CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

Ngoài ra, xét đến tính tương thích dung hợp với các tế bào u tủy được bàn luận ở dưới, chủng BALB/c trong trường hợp của chuột nhắt, và các chủng Wistar và Low trong trường hợp của chuột cống, là được đặc biệt ưu tiên làm các động vật để gây miễn dịch.

Hơn nữa, xét đến tính tương đồng giữa các kháng nguyên của người và chuột nhắt, cũng tốt hơn là sử dụng các chuột nhắt mà cơ chế sinh học của chúng để loại bỏ các tự kháng thể đã được làm giảm, tức là, các chuột nhắt mắc bệnh tự miễn.

Tuổi của các chuột nhắt hoặc chuột cống này khi gây miễn dịch tốt hơn là 5 đến 12 tuần tuổi, và tốt hơn là 6 đến 8 tuần tuổi.

Để gây miễn dịch các động vật bằng GARP hoặc thể tái tổ hợp của nó, các phương pháp đã biết, được mô tả chi tiết, ví dụ, trong Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), v.v. có thể được áp dụng.

Trong các phương pháp gây miễn dịch này, tốt hơn nếu phương pháp được áp dụng theo sáng chế cụ thể là phương pháp sau chẳng hạn.

Nói cách khác, trước tiên, các tế bào, trong đó phần protein màng dùng làm kháng nguyên, hoặc kháng nguyên đã được biểu hiện, được sử dụng qua đường trong da hoặc qua đường trong màng bụng cho động vật.

Để tăng cường hiệu quả gây miễn dịch, việc sử dụng kết hợp được ưu tiên. Nếu việc sử dụng qua đường trong da được thực hiện trong nửa đầu của chế độ sử dụng, và việc sử dụng đường trong màng bụng được thực hiện trong nửa còn lại của chế độ hoặc chỉ ở thời điểm cuối sử dụng, hiệu quả gây miễn dịch có thể được tăng cường rõ rệt.

Chế độ sử dụng kháng nguyên sẽ thay đổi tùy theo loại động vật được gây miễn dịch, các khác biệt cá thể, v.v. Nói chung, 3 đến 6 liều kháng nguyên và khoảng định liều 2 đến 6 tuần là được ưu tiên, và 3 hoặc 4 liều kháng nguyên và khoảng định liều 2 đến 4 tuần là được ưu tiên.

Liều áp dụng đối với kháng nguyên sẽ thay đổi tùy theo loại động vật được gây miễn dịch, các khác biệt cá thể, v.v.. Nó thường nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5 mg.

Liều tăng cường được thực hiện 1 đến 6 tuần, tốt hơn là 2 đến 4 tuần, và tốt hơn là 2 đến 3 tuần, sau liều sử dụng kháng nguyên được mô tả ở trên.

Liều áp dụng đối với kháng nguyên, khi liều tăng cường được thực hiện, sẽ thay đổi tùy theo loại động vật, kích thước của nó, v.v.. Trong trường hợp của chuột nhắt, ví dụ, liều áp dụng đối với kháng nguyên thường nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là 0,1 đến 0,5 mg, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2 mg.

1 đến 10 ngày, tốt hơn là 2 đến 5 ngày, và tốt hơn là 2 hoặc 3 ngày sau khi kết thúc liều tăng cường được mô tả ở trên, tế bào lách hoặc tế bào lympho chứa tế bào sản xuất kháng thể sẽ được lấy vô trùng từ động vật được gây miễn dịch. Tại thời điểm đó, hiệu giá kháng thể được đo. Động vật, trong đó hiệu giá kháng thể đã tăng đủ cao, được sử dụng làm nguồn cấp tế bào sản xuất kháng thể, để hiệu quả của các thao tác tiếp theo có thể được tăng cường.

Ví dụ về phương pháp đo hiệu giá kháng thể được sử dụng ở đây có thể bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, song không giới hạn ở đó.

Về việc đo hiệu giá kháng thể theo sáng chế, phương pháp ELISA, ví dụ, có thể được thực hiện theo các quy trình sau.

Trước tiên, kháng nguyên tinh chế hoặc tinh chế một phần được hấp phụ lên bề mặt của pha rắn, như đĩa 96 lỗ cho ELISA, và bề mặt rắn khác, trên đó kháng nguyên này chưa được hấp phụ, được phủ protein không liên quan đến kháng nguyên, như albumin huyết thanh bò (sau đây gọi là "BSA"). Các bề mặt được rửa, và tiếp theo cho tiếp xúc với mẫu pha loãng theo bậc dùng làm kháng thể sơ cấp (ví dụ, huyết thanh chuột nhắt), để kháng thể trong mẫu được liên kết với kháng nguyên được mô tả ở trên.

Sau đó, kháng thể đánh dấu enzym kháng kháng thể chuột nhắt được thêm vào làm kháng thể thứ cấp, để nó được liên kết với kháng thể chuột nhắt, sau đó rửa. Sau đó, cơ chất của enzym được thêm vào, và tiếp theo sự thay đổi hấp thụ do sự phát triển màu trên cơ sở phân hủy cơ chất, v.v., được đo, để hiệu giá kháng thể được tính.

Tế bào sản xuất kháng thể có thể được tách ra khỏi các tế bào lách hoặc tế bào lympho của động vật được gây miễn dịch theo các phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495.; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, p. 511.; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550.; Walsh, Nature, (1977) 266, p. 495). Ví dụ, trong trường hợp của tế bào lách, đã có phương pháp phổ biến là băm nhỏ lách, tiếp

theo lọc tế bào qua lưới thép không gỉ, tiếp theo tạo huyền phù chất lọc trong môi trường cần thiết tối thiểu Eagle (minimal essential medium: MEM) để tách tế bào sản xuất kháng thể.

(c) Điều chế tế bào u tủy (sau đây gọi là "u tủy")

Các tế bào u tủy dùng trong dung hợp tế bào là không được giới hạn cụ thể, và các tế bào này có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết, nếu thích hợp, và tiếp theo có thể được sử dụng. Xét đến các vấn đề phù hợp trong việc chọn tế bào lai từ các tế bào được dung hợp, dòng tế bào khuyết HGPRT (Hypoxanthine-GUANINE phosphoribosyl transferase), các quy trình chọn lọc đã được thiết lập, tốt hơn là được sử dụng.

Tức là, ví dụ về các dòng tế bào khuyết HGPRT như vậy bao gồm: X63-Ag8 được tạo ra từ chuột nhắt (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8. U1 (P3U1), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG), FO, S149/5XXO, và BU. 1; 210. RSY3. Ag. 1. 2.3 được tạo ra từ chuột cống (Y3); và U266AR được tạo ra từ người (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2), và 8226AR/NIP4-1 (NP41). Các dòng tế bào khuyết HGPRT có thể sử dụng được, ví dụ, từ American Type Culture Collection (ATCC).

Các dòng tế bào này được nuôi cấy tiếp trong môi trường thích hợp, như môi trường 8-azaguanin [môi trường được điều chế bằng cách thêm 8-azaguanin vào môi trường RPMI-1640 chứa glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamixin, và huyết thanh thai bò (sau đây gọi là "FCS")], Iscove's Modified Dulbecco's Medium (sau đây gọi là "IMDM"), hoặc Dulbecco's Modified Eagle Medium (sau đây gọi là "DMEM"). Ba hoặc bốn ngày trước khi dung hợp tế bào, các tế bào được nuôi cấy tiếp trong môi trường bình thường [ví dụ, môi trường ASF104 chứa 10% FCS (do Ajinomoto Co., Inc. sản xuất)] để đảm bảo có không ít hơn 2×10^7 tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

(d) Dung hợp tế bào

Tế bào sản xuất kháng thể có thể được dung hợp với tế bào u tủy, nếu thích hợp, theo các phương pháp đã biết (Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher

Springfield, Illinois (1964), v.v.) trong các điều kiện trong đó tỷ lệ sống của tế bào không bị giảm quá mức.

Ví dụ về phương pháp như vậy mà có thể được sử dụng ở đây bao gồm phương pháp hóa học bao gồm trộn tế bào sản xuất kháng thể với tế bào u tủy trong dung dịch polyme nồng độ cao như polyetylen glycol, và phương pháp vật lý bằng kích điện. Trong các phương pháp này, ví dụ cụ thể về phương pháp hóa học nêu trên là như sau.

Khi polyetylen glycol được sử dụng làm dung dịch polyme nồng độ cao, tế bào sản xuất kháng thể được trộn với tế bào u tủy trong dung dịch polyetylen glycol có trọng lượng phân tử 1500 đến 6000, tốt hơn là 2000 đến 4000, ở nhiệt độ 30°C đến 40°C, tốt hơn là 35°C đến 38°C, và trong 1 đến 10 phút, tốt hơn là trong 5 đến 8 phút.

(e) Chọn lọc nhóm tế bào lai

Phương pháp chọn lọc tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào được mô tả ở trên là không được giới hạn cụ thể. Nói chung, phương pháp chọn lọc HAT (hypoxanthin-aminopterin-thymidin) (Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p. 550) được áp dụng.

Phương pháp này là hữu hiệu, khi tế bào lai được thu bằng cách sử dụng tế bào u tủy thuộc dòng tế bào khuyết HGPRT không thể sống được trong aminopterin.

Cụ thể, tế bào không được dung hợp và tế bào lai được nuôi cấy trong môi trường HAT, để chỉ có tế bào lai kháng aminopterin là được giữ lại và sinh trưởng một cách chọn lọc.

(f) Phân chia thành các dòng tế bào đơn (nhân dòng vô tính)

Về phương pháp nhân dòng tế bào lai, các phương pháp đã biết như phương pháp methyl xenluloza, phương pháp agarosa mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn, ví dụ, có thể được áp dụng (xem, ví dụ, Barbara, B. M. và Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman và Company, San Francisco (1980)). Trong các phương pháp này, các phương pháp nuôi cấy ba chiều, như phương pháp methyl xenluloza, là được đặc biệt ưu tiên. Ví dụ, nhóm tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường methyl xenluloza như ClonaCell-HY Selection Medium D (do StemCell Technologies, #03804 sản xuất), và tiếp theo nuôi cấy. Sau đó, các khuẩn lạc tế bào lai tạo thành

được thu hoạch, để tế bào lai đơn dòng có thể được thu. Mỗi khuẩn lạc tế bào lai thu hoạch được được nuôi cấy, và dịch nổi nuôi cấy tế bào lai thu được, trong đó hiệu giá kháng thể ổn định được quan sát thấy, được chọn làm chủng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng GARP.

Ví dụ về chủng tế bào lai thu được theo cách này bao gồm tế bào lai GARP 151D và 198D. Trong bản mô tả này, kháng thể được sản xuất bởi tế bào lai GARP 151D và 198D được gọi là "kháng thể 151D" hoặc "kháng thể 198D" hoặc đơn giản là "151D" hoặc "198D".

Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 151D có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 151D có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự. Cần lưu ý rằng trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự. Cũng cần lưu ý rằng trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự.

Vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 198D có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 198D có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự. Cần lưu ý rằng trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự. Cũng cần lưu ý rằng trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự.

(g) Điều chế kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy tế bào lai

Tế bào lai chọn lọc theo cách này được nuôi cấy, để các kháng thể đơn dòng có thể được thu đầy đủ. Trước khi thực hiện nuôi cấy, cần sàng lọc tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng nghiên cứu.

Để sàng lọc, các phương pháp đã biết có thể được áp dụng thích hợp.

Hiệu giá kháng thể có thể được đo theo sáng chế bằng cách, ví dụ, phương pháp ELISA được mô tả trong phần (b) ở trên.

Tế bào lai thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được bảo quản trong nitơ lỏng hoặc trong máy lạnh ở nhiệt độ -80°C hoặc thấp hơn ở trạng thái đông băng.

Sau khi kết thúc nhân dòng, tế bào lai được nuôi cấy, trong khi thay môi trường HT bằng môi trường bình thường.

Nuôi cấy khối được thực hiện bằng cách nuôi cấy quay, bằng cách sử dụng chai nuôi cấy lớn. Dịch nổi thu được từ nuôi cấy khối này được tinh chế theo các phương pháp được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, như lọc gel, để thu được kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với protein theo sáng chế.

Hơn nữa, tế bào lai được tiêm vào khoang bụng của chuột nhắt thuộc cùng chủng (ví dụ, BALB/c được mô tả ở trên), hoặc chuột nhắt Nu/Nu, và tế bào lai được cho sinh trưởng trong đó, để thu được cổ trướng chứa lượng lớn kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Khi tế bào lai được sử dụng trong khoang bụng của chuột nhắt này, lượng lớn cổ trướng có thể được thu nếu dầu khoáng như 2,6,10,14-tetramethylpentadecan (pristane) trước đó đã được sử dụng cho chuột này (3 đến 7 ngày trước khi sử dụng tế bào lai).

Ví dụ, giả sử trước đó chất ức chế miễn dịch đã được sử dụng trong khoang bụng của chuột nhắt thuộc cùng chủng với tế bào lai, để tế bào T được làm bất hoạt. Hai mươi ngày sau khi tiêm, 10^6 đến 10^7 tế bào lai và/hoặc tế bào dòng vô tính được tạo huyền phù trong môi trường không chứa huyết thanh (0,5 ml), và huyền phù này tiếp theo được sử dụng trong khoang bụng. Khi bụng bình thường phồng lên và cổ trướng đã mưng mủ, cổ trướng này sẽ được lấy ra khỏi chuột. Theo phương pháp này, kháng thể đơn dòng ở nồng độ khoảng 100 lần hoặc cao hơn trong dung dịch nuôi cấy có thể được thu.

Kháng thể đơn dòng thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên có thể được tinh chế, ví dụ, bằng phương pháp được mô tả trong Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

Kháng thể đơn dòng thu được theo cách này có tính đặc hiệu kháng nguyên cao với GARP.

(h) Thử nghiệm kháng thể đơn dòng

Isotyp và typ phụ của kháng thể đơn dòng thu được theo cách này có thể được xác định như sau.

Trước tiên, ví dụ về phương pháp thử nghiệm có thể bao gồm phương pháp Ouchterlony, phương pháp ELISA, và phương pháp RIA.

Phương pháp Ouchterlony là đơn giản, song khi nồng độ kháng thể đơn dòng thấp, thì bước cô đặc là cần thiết.

Mặt khác, khi phương pháp ELISA hoặc RIA được sử dụng, dịch nổi nuôi cấy được phản ứng trực tiếp với pha rắn đã hấp phụ kháng nguyên, và kháng thể tương ứng với các isotyp hoặc lớp phụ globulin miễn dịch khác nhau được sử dụng làm kháng thể thứ cấp, để isotyp và typ phụ của kháng thể đơn dòng có thể được nhận dạng.

Về phương pháp đơn giản hơn, kit nhận dạng có bán trên thị trường (ví dụ, Mouse Typer Kit; do BioRad sản xuất), v.v. cũng có thể được sử dụng.

Hơn nữa, việc định lượng protein có thể được thực hiện bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính giá trị từ độ hấp thụ ở 280 nm [$1,4 \text{ (OD 280)} = 1 \text{ mg/ml globulin miễn dịch}$].

Ngoài ra, cũng trong trường hợp mà các bước (a) đến (h) trong mục (2) ở trên được thực hiện lại và kháng thể đơn dòng độc lập được thu riêng rẽ, kháng thể có các đặc tính tương đương với các đặc tính của kháng thể 105F, kháng thể 110F, kháng thể được tạo ra từ 151D (kháng thể 151D được nhân hóa) và kháng thể được tạo ra từ 198D (kháng thể 198D được nhân hóa) có thể được thu. Ví dụ về kháng thể như vậy có thể là kháng thể liên kết với cùng epitop, mà mỗi kháng thể được mô tả ở trên liên kết với nó. Kháng thể 105F nhận biết các vị trí trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 366 đến 377, 407 đến 445, và 456 đến 470 trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của GARP, và liên kết với chúng; kháng thể 110F nhận biết các vị trí trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 54 đến 112 và 366 đến 392 trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của GARP, và liên kết với chúng; kháng thể được tạo ra từ 151D (kháng thể

151D được nhân hóa) nhận biết trình tự axit amin tại các vị trí 352 đến 392 trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của GARP, và liên kết với chúng; và kháng thể được tạo ra từ 198D (kháng thể 198D được nhân hóa) nhận biết trình tự axit amin tại các vị trí 18 đến 112 trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của GARP, và liên kết với chúng. Do đó, ví dụ cụ thể về epitop nêu trên có thể bao gồm các vùng nêu trên trong trình tự axit amin của GARP.

Nếu kháng thể đơn dòng vừa điều chế được liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc ba chiều riêng phần mà kháng thể 105F, v.v., được mô tả ở trên liên kết với nó, có thể xác định rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 105F, v.v., được mô tả ở trên liên kết với nó. Hơn nữa, bằng cách xác nhận rằng kháng thể đơn dòng cạnh tranh với các kháng thể được mô tả ở trên như kháng thể 105F trong việc liên kết các kháng thể với GARP (tức là, kháng thể đơn dòng ngăn cản sự liên kết của các kháng thể được mô tả ở trên như kháng thể 105F với GARP), có thể xác định rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 105F, v.v., được mô tả ở trên liên kết với nó, ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc đặc hiệu của epitop không được xác định. Khi xác nhận được rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop mà kháng thể 105F, v.v., được mô tả ở trên liên kết với nó, thì tin chắc rằng kháng thể đơn dòng có các đặc tính tương đương với các đặc tính của các kháng thể được mô tả ở trên như kháng thể 105F.

(3) Các kháng thể khác

Kháng thể theo sáng chế còn bao gồm các kháng thể tái tổ hợp di truyền được cải biến nhân tạo nhằm làm giảm tính kháng nguyên khác loại gây ra cho người, như kháng thể dạng khảm, kháng thể được nhân hóa và các kháng thể được mô tả ở trên, cũng như kháng thể đơn dòng kháng GARP được mô tả ở trên. Các kháng thể này có thể được sản xuất bằng các phương pháp đã biết.

Kháng thể thu được có thể được tinh chế đến trạng thái đồng nhất. Để tách và tinh chế kháng thể này, các phương pháp tách và tinh chế dùng cho các protein bình thường có thể được sử dụng. Ví dụ, sắc ký cột, lọc, siêu lọc, kết tủa bằng muối, thẩm tách, điện di gel polyacrylamit điều chế, điện di đẳng điện, v.v., được lựa chọn và kết hợp với nhau một cách thích hợp, để kháng thể có thể được tách và tinh chế (Strategies

for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), song ví dụ về các phương pháp tách và tinh chế không được giới hạn ở đó.

Ví dụ về sắc ký có thể bao gồm sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký đảo pha, và sắc ký hấp thụ.

Các kỹ thuật sắc ký này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Ví dụ về cột dùng trong sắc ký ái lực có thể bao gồm cột Protein A và cột Protein G. Ví dụ về cột sử dụng Protein A có thể bao gồm Hyper D, POROS, và Sepharose F. F. (Pharmacia).

Tương tự, bằng cách sử dụng chất mang cố định kháng nguyên, kháng thể có thể được tinh chế bằng cách sử dụng hoạt tính liên kết của kháng thể với kháng nguyên.

Các kháng thể thu được được đánh giá, về hoạt tính liên kết của chúng với kháng nguyên, theo phương pháp được mô tả trong các ví dụ được bàn luận ở dưới, v.v., để kháng thể điều chế được có thể được chọn lọc.

Tính ổn định của kháng thể có thể được sử dụng làm chỉ thị để so sánh các đặc tính của kháng thể. Nhiệt kế quét vi phân (differential scanning calorimeter: DSC) là thiết bị có khả năng đo nhanh chóng và chính xác điểm giữa biến tính nhiệt (thermal denaturation midpoint: T_m) là chỉ thị tốt cho tính ổn định cấu trúc tương đối của protein. Bằng cách sử dụng DSC để đo các giá trị T_m và so sánh liên quan đến các giá trị thu được, các khác biệt về tính ổn định nhiệt có thể được so sánh. Biết rằng tính ổn định bảo toàn của kháng thể có tương quan nhất định với tính ổn định nhiệt của kháng thể (Lori Burton, et al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, pp. 265-273), và do đó, kháng thể được ưu tiên có thể được chọn bằng cách sử dụng tính ổn định nhiệt làm chỉ thị. Ví dụ về các chỉ thị khác để chọn kháng thể có thể bao gồm hiệu suất cao trong tế bào chủ thích hợp và kết tụ thấp trong dung dịch nước. Ví dụ, do kháng thể có hiệu suất cao nhất luôn không biểu hiện tính ổn định nhiệt cao nhất, nên

cần chọn kháng thể thích hợp nhất để sử dụng cho người bằng cách xác định nó một cách toàn diện trên cơ sở các chỉ thị nêu trên.

Ví dụ về kháng thể người kháng GARP theo sáng chế có thể là kháng thể người kháng GARP thu được bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn được mô tả ở trên, và ví dụ ưu tiên về kháng thể người kháng GARP này có thể bao gồm kháng thể 105F và kháng thể 110F, mỗi kháng thể này có cấu trúc sau.

Chuỗi nặng của kháng thể 105F có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 118 là vùng biến đổi, trong khi trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 119 đến 448 là vùng ổn định. Trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự, vùng biến đổi này có CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 26 đến 35, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 50 đến 66, và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 99 đến 107. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 2 được thể hiện trên Fig.2.

Chuỗi nhẹ của kháng thể 105F có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 112 là vùng biến đổi, trong khi trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 113 đến 217 là vùng ổn định. Trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, vùng biến đổi này có CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 23 đến 36, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 52 đến 58, và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 91 đến 101. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 3 được thể hiện trên Fig.3.

Chuỗi nặng của kháng thể 110F có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 123 là vùng biến đổi, trong khi trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 124 đến 453 là vùng ổn định. Trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, vùng biến đổi này có CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 26 đến 35,

CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 50 đến 66, và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 99 đến 112. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 4 được thể hiện trên Fig.4.

Chuỗi nhẹ của kháng thể 110F có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 111 là vùng biến đổi, trong khi trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 112 đến 216 là vùng ổn định. Trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, vùng biến đổi này có CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 23 đến 36, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 52 đến 58, và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 91 đến 100. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 5 được thể hiện trên Fig.5.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể 105F nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 354 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 105F, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 355 đến 1344 mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể 105F. Như nêu trong SEQ ID NO: 6, trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi có polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 76 đến 105 mã hóa CDRH1, polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 148 đến 198 mã hóa CDRH2, và polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 295 đến 321 mã hóa CDRH3. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 6 được thể hiện trên Fig.6.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể 105F nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 336 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 105F, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 337 đến 651 mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể 105F. Như nêu trong SEQ ID NO: 7, trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi có

polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 67 đến 108 mã hóa CDRL1, polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 154 đến 174 mã hóa CDRL2, và polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 271 đến 303 mã hóa CDRL3. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 7 được thể hiện trên Fig.7.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể 110F nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 369 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 110F, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 370 đến 1359 mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể 110F. Như nêu trong SEQ ID NO: 8, trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi có polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 76 đến 105 mã hóa CDRH1, polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 148 đến 198 mã hóa CDRH2, và polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 295 đến 336 mã hóa CDRH3. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 8 được thể hiện trên Fig.8.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể 110F nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 333 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 110F, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 334 đến 648 mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể 110F. Như nêu trong SEQ ID NO: 9, trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi có polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 67 đến 108 mã hóa CDRL1, polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 154 đến 174 mã hóa CDRL2, và polynucleotit gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 271 đến 300 mã hóa CDRL3. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 9 được thể hiện trên Fig.9.

Liên quan đến kháng thể theo sáng chế, ngoài kháng thể người kháng GARP được mô tả ở trên, thậm chí trong trường hợp mà kháng thể độc lập được thu một cách riêng rẽ theo phương pháp khác với phương pháp được mô tả ở trên để thu kháng thể, các kháng thể có tính gây độc tế bào tương đương với tính gây độc tế bào của kháng

thể 105F hoặc kháng thể 110F có thể được thu. Ví dụ kháng thể như vậy có thể là kháng thể liên kết với cùng epitop mà kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F liên kết với nó.

Nếu kháng thể người vừa sản xuất được liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc ba chiều riêng phần, mà kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F liên kết với nó, có thể xác định rằng kháng thể sản xuất được liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F liên kết với nó. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể nghiên cứu cạnh tranh với kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F về việc liên kết của chúng với GARP (tức là, kháng thể nghiên cứu ngăn cản sự liên kết của kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F với GARP), có thể xác định rằng kháng thể nghiên cứu liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F liên kết với nó, ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc đặc hiệu của epitop này chưa được xác định. Nếu xác nhận được rằng kháng thể nghiên cứu liên kết với cùng epitop mà kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F liên kết với nó, thì tin chắc rằng kháng thể nghiên cứu có thể có tính gây độc tế bào tương đương với tính gây độc tế bào của kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm các kháng thể được cải biến nhân tạo, tái tổ hợp di truyền. Các kháng thể này có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Kháng thể nghiên cứu tốt hơn là kháng thể có ít nhất là 6 CDR giống như chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F được mô tả ở trên, và cũng có hoạt tính ADCC và hoạt tính ức chế đối với chức năng ức chế miễn dịch của Treg. Kháng thể nghiên cứu không được giới hạn ở kháng thể đặc hiệu, miễn là nó có các đặc tính nêu trên. Kháng thể tốt hơn là kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F được mô tả ở trên.

Ngoài ra, bằng cách kết hợp các trình tự thể hiện tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nặng và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F, có thể chọn được kháng thể có hoạt tính tương đương với kháng thể được mô tả ở trên. Nói chung, độ tương đồng như vậy là độ tương đồng 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn, và tốt nhất là 99% hoặc lớn

hơn (tuy nhiên, mỗi CDR là giống với CDR của mỗi kháng thể được mô tả ở trên). Ngoài ra, cũng có thể chọn được kháng thể có hoạt tính tương đương với mỗi kháng thể được mô tả ở trên bằng cách hợp nhất trình tự axit amin chứa đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin vào trình tự axit amin của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được mô tả ở trên (ngoại trừ mỗi vị trí CDR).

Ngoài ra, ví dụ về kháng thể kháng GARP theo sáng chế có thể bao gồm các kháng thể dạng khảm và kháng thể được nhân hóa sau.

Ví dụ về kháng thể dạng khảm có thể bao gồm các kháng thể trong đó vùng biến đổi và vùng ổn định là khác nhau, như kháng thể dạng khảm được tạo ra bằng cách liên hợp vùng biến đổi của kháng thể được tạo ra từ chuột nhắt hoặc chuột cống với vùng ổn định được tạo ra từ người (xem Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984)).

Kháng thể dạng khảm được tạo ra từ kháng thể chuột cống kháng GARP người 151D là kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 117 nêu trong SEQ ID NO: 15, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 109 nêu trong SEQ ID NO: 17, và kháng thể dạng khảm này có thể có vùng ổn định được tạo ra từ người xác định bất kỳ.

Hơn nữa, kháng thể dạng khảm được tạo ra từ kháng thể chuột cống kháng GARP người 198D là kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 120 nêu trong SEQ ID NO: 19, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 109 nêu trong SEQ ID NO: 21, và kháng thể dạng khảm này có thể có vùng ổn định được tạo ra từ người xác định bất kỳ.

Ví dụ về kháng thể dạng khảm như vậy có thể bao gồm: kháng thể gồm có chuỗi nặng có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 25 trong danh mục trình tự, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 27; và kháng thể gồm có chuỗi nặng có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến

469 nêu trong SEQ ID NO: 29 trong danh mục trình tự, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 31.

Cần lưu ý rằng, trong trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 25 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 136 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 137 đến 466 là vùng ổn định.

Cũng cần lưu ý rằng, trong trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 27 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 130 đến 234 là vùng ổn định.

Ngoài ra cần lưu ý rằng, trong trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 29 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 139 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 140 đến 469 là vùng ổn định.

Ngoài ra cần lưu ý rằng, trong trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 31 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 130 đến 234 là vùng ổn định.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể c151D nêu trong SEQ ID NO: 25 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 24 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 57 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 24 trong danh mục trình tự mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể c151D, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể c151D, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các

vị trí nucleotit 409 đến 1398 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể c151D.

Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể c151D nêu trong SEQ ID NO: 27 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 26 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 60 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 26 trong danh mục trình tự mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể c151D, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể c151D, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể c151D.

Ngoài ra, trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể c198D nêu trong SEQ ID NO: 29 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 28 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 57 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 28 trong danh mục trình tự mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể c198D, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 417 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể c198D, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 418 đến 1407 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể c198D.

Ngoài ra, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể c198D nêu trong SEQ ID NO: 31 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 30 trong danh mục trình tự. Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 60 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 30 trong danh mục trình tự mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể c198D, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể c198D, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể c198D.

Ví dụ về kháng thể được nhân hóa bao gồm kháng thể được nhân hóa được tạo ra bằng cách hợp nhất vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) vào kháng thể được tạo ra từ người (xem Nature (1986) 321, p. 522-525), và kháng thể được nhân hóa được tạo ra bằng cách ghép các gốc axit amin trong các khung đọc nhất định, cũng như các trình tự CDR, vào kháng thể người theo phương pháp ghép CDR (Công bố đơn quốc tế số WO90/07861).

Tuy nhiên, kháng thể được nhân hóa được tạo ra từ kháng thể 151D không được giới hạn ở kháng thể được nhân hóa cụ thể, miễn là nó giữ lại toàn bộ 6 trình tự CDR của kháng thể 151D và có hoạt tính trị khối u.

Cần lưu ý rằng vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 151D có CDRH1 (GFTFSNYYMA) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 26 đến 35 trong SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự, CDRH2 (SIGTVGGNTY) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 50 đến 59 trong SEQ ID NO: 15 trong đó, và CDRH3 (EDYGGFPH) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 99 đến 106 trong SEQ ID NO: 15 trong đó.

Ngoài ra, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 151D có CDRL1 (KASQNVGTNVD) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 24 đến 34 trong SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự, CDRL2 (GASNRYT) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 50 đến 56 trong SEQ ID NO: 17 trong đó, và CDRL3 (LQYKYNPYT) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 89 đến 97 trong SEQ ID NO: 17 trong đó.

Hơn nữa, vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 198D có CDRH1 (GFSLTSTFHVS) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 26 đến 35 trong SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự, CDRH2 (TISSGGGTY) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 50 đến 58 trong SEQ ID NO: 19 trong đó, và CDRH3 (ISGWGHYYVMDV) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 98 đến 109 trong SEQ ID NO: 19 trong đó.

Ngoài ra, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 198D có CDRL1 (QASEDIYSGLA) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 24 đến 34 trong SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự, CDRL2 (GAGSLQD) gồm có

trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 50 đến 56 trong SEQ ID NO: 21 trong đó, và CDRL3 (QQGLKFPLT) gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 89 đến 97 trong SEQ ID NO: 21 trong đó.

Ví dụ cụ thể về kháng thể được nhân hóa của kháng thể chuột cống 151D có thể là tổ hợp xác định bất kỳ của: chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự bất kỳ trong số (1) trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33 (h151D-H1) hoặc 35 (h151D-H4) trong danh mục trình tự, (2) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (1) ở trên, và (3) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (1) ở trên; và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự bất kỳ trong số (4) trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37 (h151D-L1) hoặc 39 (h151D-L4), (5) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (4) ở trên, và (6) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (4) ở trên.

Mặt khác, ví dụ cụ thể về kháng thể được nhân hóa của kháng thể chuột cống 198D có thể là tổ hợp xác định bất kỳ của : chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự bất kỳ trong số (1) trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 139 nêu trong SEQ ID NO: 41 (h198D-H3) trong danh mục trình tự, (2) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (1) ở trên, và (3) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (1) ở trên; và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự bất kỳ trong số (4) trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 43 (h198D-L4) trong danh mục trình tự, (5) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi

trình tự CDR trong trình tự của (4) ở trên, và (6) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong trình tự của (4) ở trên.

Ví dụ về tổ hợp ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa 151D có thể bao gồm: kháng thể gồm có chuỗi nặng có vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33, và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37; và kháng thể gồm có chuỗi nặng có vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 35, và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 39.

Ví dụ về tổ hợp ưu tiên hơn có thể bao gồm: kháng thể (h151D-H1L1) gồm có chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 37; và kháng thể (h151D-H4L4) gồm có chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39.

Ví dụ về tổ hợp ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa 198D có thể là kháng thể gồm có chuỗi nặng có vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 139 nêu trong SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 43.

Ví dụ về tổ hợp ưu tiên hơn có thể là kháng thể (h198D-H3L4) gồm có chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

Bằng cách các trình tự thể hiện tương đồng cao với các trình tự axit amin chuỗi nặng và các trình tự axit amin chuỗi nhẹ được mô tả ở trên, có thể chọn được kháng thể có tính gây độc tế bào tương đương với tính gây độc tế bào của mỗi các kháng thể được mô tả ở trên. Nói chung, tương đồng như vậy là tương đồng 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, hơn tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn, và tốt nhất là 99%

hoặc lớn hơn. Hơn nữa, cũng bằng cách kết hợp với nhau, các trình tự axit amin bao gồm đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài gốc axit amin liên quan đến trình tự axit amin của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, có thể chọn được kháng thể có tính gây độc tế bào tương đương với tính gây độc tế bào của mỗi các kháng thể được mô tả ở trên.

Cần lưu ý rằng thuật ngữ "vài" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là 1 đến 10, 1 đến 9, 1 đến 8, 1 đến 7, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2.

Thay thế axit amin trong bản mô tả này tốt hơn là thay thế axit amin bảo toàn. Thay thế axit amin bảo toàn là thay thế xảy ra trong nhóm axit amin liên quan đến các chuỗi bên axit amin xác định. Các nhóm axit amin ưu tiên là như sau: nhóm axit = axit aspartic và axit glutamic; nhóm bazơ = lysin, arginin, và histidin; nhóm không phân cực = alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, và tryptophan; và nhóm phân cực không mang điện = glyxin, asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, và tyrosin. Các nhóm axit amin ưu tiên khác là như sau: nhóm hydroxy béo = serin và threonin; nhóm chứa amit = asparagin và glutamin; nhóm béo = alanin, valine, leuxin và isoleuxin; và nhóm thơm = phenylalanin, tryptophan và tyrosin. Thay thế axit amin như vậy tốt hơn là được thực hiện tới mức các đặc tính của một chất có trình tự axit amin ban đầu không bị suy yếu.

Tương đồng giữa hai loại trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng các thông số mặc định của thuật toán Blast phiên bản 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, và David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST và PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Thuật toán Blast cũng có thể được sử dụng bằng cách truy cập www.ncbi.nlm.nih.gov/blast qua internet. Cần lưu ý rằng tương đồng giữa trình tự nucleotit của kháng thể theo sáng chế và trình tự nucleotit của kháng thể khác có thể cũng được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Blast.

Trong trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 151D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 33 hoặc 35 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các

gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 136 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 137 đến 466 là vùng ổn định.

Hơn nữa, trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể 151D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc 39 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 130 đến 234 là vùng ổn định.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 198D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 41 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 20 đến 139 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 140 đến 469 là vùng ổn định.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể 198D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 43 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 21 đến 129 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin gồm có các gốc axit amin tại các vị trí 130 đến 234 là vùng ổn định.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 151D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 33 hoặc 35 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 32 hoặc 34 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 33 được thể hiện trên Fig.21, trình tự của SEQ ID NO: 35 được thể hiện trên Fig.23, trình tự của SEQ ID NO: 32 được thể hiện trên Fig.31, và trình tự của SEQ ID NO: 34 được thể hiện trên Fig.33.

Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 57 trong mỗi trình tự nucleotit mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể 151D được nhân hóa, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 151D được nhân hóa, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 409 đến 1398 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể 151D được nhân hóa

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 198D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 41 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 40 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 41 được thể hiện trên Fig.25, và trình tự của SEQ ID NO: 40 được thể hiện trên Fig.35.

Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 57 trong trình tự nucleotit nêu trên mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể 198D được nhân hóa, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 417 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 198D được nhân hóa, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 418 đến 1407 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể 198D được nhân hóa.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể 151D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc 39 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 36 hoặc 38 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 37 được thể hiện trên Fig.22, trình tự của SEQ ID NO: 39 được thể hiện trên Fig.24, trình tự của SEQ ID NO: 36 được thể hiện trên Fig.32, và trình tự của SEQ ID NO: 38 được thể hiện trên Fig.34.

Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 60 trong mỗi trình tự nucleotit mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể 151D được nhân hóa, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 151D được nhân hóa, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể 151D được nhân hóa.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể 198D được nhân hóa nêu trong SEQ ID NO: 43 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 42 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 43 được thể hiện trên Fig.26, và trình tự của SEQ ID NO: 42 được thể hiện trên Fig.36.

Trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 60 trong trình tự nucleotit nêu trên mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể 198D được nhân hóa, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 trong đó mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 198D được nhân hóa, và

trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702 trong đó mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể 198D được nhân hóa.

Độ tương đồng giữa các trình tự nucleotit này và các trình tự nucleotit của các kháng thể khác có thể cũng được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Blast.

Ví dụ khác về kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể người liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa cũng liên kết với nó. Kháng thể người kháng GARP có nghĩa là kháng thể người có duy nhất trình tự gen của kháng thể được tạo ra từ nhiễm sắc thể người. Kháng thể người kháng GARP có thể được thu bằng phương pháp nêu trên.

Nếu kháng thể người vừa sản xuất được liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc ba chiều riêng phần, mà kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa liên kết với nó, có thể xác định được rằng kháng thể người liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa liên kết với nó. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể người cạnh tranh với kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa về việc liên kết của chúng với GARP (tức là, kháng thể người ngăn cản sự liên kết của kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa với GARP), có thể xác định được rằng kháng thể người liên kết với cùng epitop, mà kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa liên kết với nó, ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc đặc hiệu của epitop chưa được xác định. Nếu xác nhận được rằng kháng thể người liên kết với cùng epitop mà kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa liên kết với nó, thì tin chắc rằng kháng thể người có thể có tính gây độc tế bào tương đương với tính gây độc tế bào của kháng thể 151D được nhân hóa hoặc kháng thể 198D được nhân hóa.

Kháng thể dạng khảm, kháng thể được nhân hóa, hoặc kháng thể người thu được bằng các phương pháp nêu trên được đánh giá bằng các phương pháp được mô tả sau trong các ví dụ, v.v., về hoạt tính liên kết với kháng nguyên, và do đó, kháng thể ưu tiên có thể được chọn.

Sáng chế cũng bao gồm cải biến kháng thể. Thuật ngữ "cải biến" được sử dụng ở đây để chỉ kháng thể theo sáng chế, mà được cải biến hóa học hoặc sinh học. Ví dụ

về cải biến hóa học này bao gồm sự liên kết của nhóm hóa học với khung axit amin, và cải biến hóa học của mạch hydratecarbon liên kết với N hoặc liên kết với O. Ví dụ về cải biến sinh học này bao gồm các kháng thể đã trải qua cải biến hậu dịch mã (ví dụ, cải biến mạch đường liên kết với N hoặc liên kết với O, xử lý đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C, khử amit, đồng phân hóa axit aspartic, và oxy hóa methionin), và các kháng thể, mà đầu tận cùng N của gốc methionin được thêm vào đó do đã được biểu hiện bằng cách sử dụng tế bào chủ không có nhân điển hình. Ngoài ra, cải biến này cũng bao gồm các kháng thể được đánh dấu để cho phép phát hiện hoặc phân lập kháng thể theo sáng chế hoặc kháng nguyên, như, ví dụ, kháng thể được đánh dấu enzym, kháng thể được đánh dấu chất huỳnh quang, và kháng thể được đánh dấu ái lực. Nhờ cải biến này kháng thể theo sáng chế là hữu ích để cải thiện tính ổn định và thời gian lưu giữ trong máu của kháng thể ban đầu theo sáng chế, làm giảm tính kháng nguyên, phát hiện hoặc phân lập kháng thể này hoặc kháng nguyên, v.v..

Hơn nữa, bằng cách điều tiết cải biến mạch đường (glycosyl hóa, khử fucosyl hóa, v.v.) liên kết với kháng thể theo sáng chế, tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể có thể được tăng cường. Về kỹ thuật điều tiết cải biến mạch đường của kháng thể, các kỹ thuật được mô tả trong WO99/54342, WO2000/61739, WO2002/31140, v.v. là đã được biết, song không giới hạn ở đó. Kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể trong đó cải biến mạch đường nêu trên đã được điều tiết.

Sau khi gen kháng thể đã được phân lập, gen này được đưa vào tế bào chủ thích hợp để sản xuất kháng thể, bằng cách sử dụng tổ hợp thích hợp gồm tế bào chủ và vector biểu hiện. Ví dụ cụ thể về gen kháng thể có thể là tổ hợp của gen mã hóa trình tự chuỗi nặng của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và gen mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả trong đó. Sau khi biến nạp vào tế bào chủ, gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ có thể được cài vào vector biểu hiện duy nhất, hoặc thay vào đó mỗi gen này có thể được cài vào các vector biểu hiện khác nhau.

Khi tế bào có nhân điển hình được sử dụng làm tế bào chủ, các tế bào động vật, tế bào thực vật hoặc vi sinh vật có nhân điển hình có thể được sử dụng. Ví dụ về tế bào động vật bao gồm tế bào động vật có vú như tế bào COS là tế bào khỉ (Gluzman, Y., Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi chuột nhắt NIH3T3

(ATCC No. CRL-1658), và dòng tế bào khuyết dihydrofolat reductaza - thuộc tế bào trứng chuột túi má Trung Quốc (tế bào CHO, ATCC CCL-61) (Urlaub, G. và Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, p. 4126-4220).

Khi tế bào không có nhân điển hình được sử dụng làm tế bào chủ, *Escherichia coli* hoặc *Bacillus subtilis* có thể được sử dụng, ví dụ.

Gen kháng thể nghiên cứu được đưa vào các tế bào này để biến nạp, và tiếp theo tế bào đã biến nạp được nuôi cấy *in vitro* để thu kháng thể. Trong nuôi cấy nêu trên, đây là các trường hợp mà hiệu suất sẽ thay đổi tùy theo trình tự của kháng thể, và do đó, có thể chọn được kháng thể, mà dễ dàng được sản xuất thành dược phẩm, từ các kháng thể có hoạt tính liên kết tương đương, bằng cách sử dụng hiệu suất làm chỉ thị. Do đó, kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên để sản xuất kháng thể, mà được đặc trưng ở chỗ nó bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ đã biến nạp và bước thu kháng thể nghiên cứu từ môi trường nuôi cấy thu được trong bước nêu trên.

Biết rằng gốc lysin tại đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể sản xuất được trong tế bào động vật có vú nuôi cấy được loại bỏ (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), và cũng biết rằng hai gốc axit amin tại đầu tận cùng carboxyl chuỗi nặng, glyxin và lysin, được loại bỏ, và rằng gốc prolin nằm tại đầu tận cùng carboxyl vừa mới được amit hóa (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, việc làm khuyết đoạn này và cải biến các trình tự chuỗi nặng này không có ảnh hưởng đến hoạt tính liên kết với kháng nguyên và chức năng tác động (hoạt hóa bổ thể, tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, v.v.) của kháng thể. Do đó, sáng chế cũng bao gồm kháng thể đã trải qua cải biến nêu trên, và ví dụ cụ thể về kháng thể như vậy bao gồm đột biến khuyết đoạn bao gồm đoạn khuyết gồm 1 hoặc 2 axit amin tại đầu tận cùng carboxyl chuỗi nặng, và đột biến khuyết đoạn được tạo ra bằng cách amit hóa đột biến khuyết đoạn nêu trên (ví dụ, chuỗi nặng trong đó gốc prolin tại vị trí đầu tận cùng carboxyl được amit hóa). Tuy nhiên, các đột biến khuyết đoạn liên quan đến đoạn khuyết tại đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế là không được giới hạn ở các đột biến khuyết đoạn được mô tả ở trên, miễn là chúng vẫn giữ được hoạt tính liên kết với kháng nguyên và chức năng tác

động. Hai chuỗi nặng cấu thành kháng thể theo sáng chế có thể thuộc loại chuỗi nặng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể có chiều dài đầy đủ và các đột biến khuyết đoạn được mô tả ở trên, hoặc tổ hợp hai loại bất kỳ được chọn từ nhóm nêu trên. Tỷ lệ các đột biến khuyết đoạn riêng rẽ có thể có thể bị ảnh hưởng bởi các loại tế bào động vật có vú nuôi cấy sản xuất kháng thể theo sáng chế, và các điều kiện nuôi cấy. Thành phần chính của kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể mà tại đó một gốc axit amin được loại bỏ tại mỗi đầu tận cùng carboxyl của hai chuỗi nặng.

Ví dụ về isotyp của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm IgG (IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4). Ngoài ra, IgG1 và IgG2 là được ưu tiên.

Ví dụ về chức năng chung của kháng thể có thể bao gồm hoạt tính liên kết với kháng nguyên, hoạt tính trung hòa hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính ADCC, hoạt tính thực bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), và hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxic: CDC). Chức năng của kháng thể theo sáng chế là hoạt tính liên kết với GARP, tốt hơn là hoạt tính ADCC, và tốt hơn là tính gây độc tế bào (hoạt tính trị khối u) gây ra do việc ức chế chức năng Treg qua trung gian ADCC. Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể có hoạt tính ADCP và/hoặc CDC, cũng như hoạt tính ADCC. Cụ thể, liên quan đến các dược phẩm bao gồm các kháng thể trị khối u hiện có, đã có thông báo rằng các dược phẩm tác động trực tiếp đến tế bào khối u để phong bế các tín hiệu tăng sinh, rằng chúng tác động trực tiếp đến tế bào khối u để cảm ứng các tín hiệu chết tế bào, rằng chúng ức chế quá trình tạo mạch mới, rằng chúng gây ra hoạt tính ADCC qua tế bào NK, và rằng chúng cảm ứng hoạt tính CDC qua bổ thể để ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u (J Clin Oncol 28: 4390-4399. (2010), Clin Cancer Res; 16 (1); 11-20. (2010)). Tuy nhiên, liên quan đến hoạt tính ADCP của kháng thể kháng GARP theo sáng chế, ít nhất, các tác giả sáng chế đã biết rằng hoạt tính ADCP đã được thông báo là hoạt tính của dược phẩm bao gồm kháng thể trị khối u kháng GARP.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đã được multimer hóa để tăng cường ái lực với kháng nguyên. Kháng thể cần multimer hóa có thể thuộc loại kháng thể duy nhất, hoặc nhiều kháng thể nhận biết nhiều epitop của kháng nguyên duy nhất.

Ví dụ về phương pháp multimer hóa kháng thể có thể bao gồm liên kết vùng IgG CH3 với hai scFv (single-chain antibodies), liên kết kháng thể với streptavidin, và đưa vào kiểu xoắn-ngoặt-xoắn (helix-turn-helix).

Kháng thể theo sáng chế có thể cũng là kháng thể đa dòng, nó là hỗn hợp của nhiều loại kháng thể kháng GARP có các trình tự axit amin khác nhau. Ví dụ về kháng thể đa dòng có thể là hỗn hợp của nhiều loại kháng thể có các CDR khác nhau. Về kháng thể đa dòng này, kháng thể thu được bằng cách nuôi cấy hỗn hợp tế bào sản xuất các kháng thể khác nhau và tiếp theo tình chế môi trường nuôi cấy thu được có thể được sử dụng (xem WO2004/061104).

Về cải biến kháng thể, kháng thể liên kết với các loại phân tử như polyetylen glycol (PEG) có thể được sử dụng.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể là thể liên hợp được tạo ra bởi kháng thể này và dược chất khác (Thể liên hợp miễn dịch). Kháng thể như vậy có thể là, ví dụ, kháng thể liên kết với chất phóng xạ hoặc hợp chất có tác dụng dược lý (Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146). Ví dụ về kháng thể như vậy có thể bao gồm Indium (^{111}In) Capromab pendetide, Technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) Nofetumomab merpentan, Indium (^{111}In) Ibritumomab, Yttrium (^{90}Y) Ibritumomab, và Iodine (^{131}I) Tositumomab.

3. Dược phẩm chứa kháng thể kháng GARP

Do kháng thể thu được bằng phương pháp được mô tả trong phần "2. Sản xuất kháng thể kháng GARP" ở trên biểu hiện tính gây độc tế bào đối với Treg, nó có thể được sử dụng làm dược phẩm, và cụ thể, làm chất điều trị đối với bệnh ung thư và bệnh lây nhiễm (cụ thể, bệnh sốt rét và nhiễm HIV).

Tính gây độc tế bào do kháng thể *in vitro* gây ra có thể được đo trên cơ sở hoạt tính ức chế các đáp ứng tăng sinh của tế bào.

Ví dụ, dòng tế bào ung thư biểu hiện quá mức GARP được nuôi cấy, và các kháng thể có các nồng độ khác nhau được thêm vào hệ nuôi cấy. Sau đó, hoạt tính ức chế của kháng thể đối với sự tạo tiêu điểm, sự tạo khuẩn lạc và tăng trưởng dạng cầu có thể được đo.

Các tác dụng điều trị *in vivo* của kháng thể đối với bệnh ung thư của động vật thí nghiệm có thể được đo, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể cho chuột trụi lông trong đó dòng tế bào ung thư biểu hiện quá mức GARP đã được cấy vào, và tiếp theo đo mức thay đổi trong các tế bào ung thư.

Ví dụ về loại ung thư có thể bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô niệu, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u nguyên bào đệm đa dạng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, và bệnh ung thư máu. Tuy nhiên, loại ung thư không được giới hạn ở các ví dụ nêu trên, miễn là các tế bào ung thư, dưới dạng đích điều trị, biểu hiện GARP.

Để làm chất được sử dụng trong thuốc chấp nhận được đối với dược phẩm theo sáng chế, chất không độc cho đối tượng, mà dược phẩm sẽ được sử dụng cho nó, là được ưu tiên, về liều áp dụng hoặc nồng độ áp dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm dược chất để biến đổi hoặc duy trì pH, áp suất thẩm thấu, độ nhớt, độ trong suốt, màu sắc, tính đẳng trương, tính vô trùng, tính ổn định, độ hòa tan, tốc độ giải phóng ổn định, độ hấp thụ, và tính thấm. Ví dụ về dược chất có thể bao gồm các chất sau, song không giới hạn ở đó: axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin; các chất kháng khuẩn; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic, natri sulfat hoặc natri hydro sulfit; các đệm như phosphat, xitrat hoặc đệm borat, natri hydro cacbonat, hoặc dung dịch Tris-HCl; chất đệm như manitol hoặc glyxin; chất tạo chelat như axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA); chất tạo phức như cafein, polyvinylpyrrolidin, β -cyclodextrin hoặc hydroxypropyl- β -cyclodextrin; chất tạo khối như glucoza, mannoza hoặc dextrin; các hydratcacbon khác như monosacarit hoặc disacarit; chất màu; chất điều vị; chất pha loãng; chất nhũ hóa; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidin; polypeptit có trọng lượng phân tử thấp; các ion trái dấu tạo muối; chất khử trùng như benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salicylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, chlorhexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit; dung môi như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol; rượu đường như manitol hoặc sorbitol; polysorbate như chất tạo huyền phù,

sorbitan este, polysorbate 20 hoặc polysorbate 80; chất hoạt động bề mặt như Triton, tromethamin, lexitin hoặc cholesterol; chất tăng cường tính ổn định như sucroza hoặc sorbitol; chất tạo huyền phù; chất tăng cường tính đàn hồi như natri clorua, kali clorua, manitol hoặc sorbitol; chất vận chuyển; tá dược; và/hoặc chất phụ trợ dược dụng. Các dược chất này tốt hơn là được thêm vào kháng thể kháng GARP với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100 lần, cụ thể, 0,1 đến 10 lần so với trọng lượng của kháng thể kháng GARP. Thành phần ưu tiên của dược phẩm trong công thức có thể được xác định, nếu thích hợp, bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, tùy theo bệnh đích, đường sử dụng dược áp dụng, v.v..

Tá dược hoặc chất mang trong dược phẩm có thể là chất lỏng hoặc chất rắn. Tá dược hoặc chất mang thích hợp có thể là nước tiêm, nước muối thường, dịch não tủy nhân tạo, hoặc các chất khác được sử dụng phổ biến để dùng ngoài đường tiêu hóa. Nước muối thường trung tính hoặc nước muối thường bao gồm albumin huyết thanh cũng có thể được sử dụng làm chất mang. Dược phẩm có thể bao gồm đệm Tris có pH 7,0-8,5, đệm axetat có pH 4,0-5,5, hoặc đệm xitrat có pH 3,0-6,2. Ngoài ra, các đệm này có thể cũng bao gồm sorbitol hoặc các hợp chất khác.

Ví dụ về dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm dược phẩm chứa kháng thể kháng GARP và dược phẩm chứa kháng thể kháng GARP và ít nhất một chất điều trị ung thư. Dược phẩm theo sáng chế dưới dạng dược chất có thành phần đã chọn và độ tinh khiết cần thiết ở dạng sản phẩm đông khô hoặc dạng lỏng. Dược phẩm như vậy chứa kháng thể kháng GARP và dược phẩm chứa kháng thể kháng GARP và ít nhất một chất điều trị ung thư có thể cũng được đúc thành sản phẩm đông khô bao gồm tá dược thích hợp như sucroza.

Chất điều trị ung thư bao gồm, cùng với kháng thể kháng GARP, trong dược phẩm được mô tả ở trên có thể được sử dụng cho cá thể theo cách đồng thời, riêng rẽ, hoặc liên tục, cùng với kháng thể kháng GARP. Theo cách khác, mỗi chất điều trị ung thư và kháng thể kháng GARP có thể được sử dụng cho đối tượng ở các khoảng thời gian sử dụng khác nhau. Ví dụ về chất điều trị ung thư như vậy có thể bao gồm abraxan, carboplatin, cisplatin, gemcitabin, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastin, các dược chất được mô tả trong Công bố đơn quốc

tế số WO2003/038043, chất tương tự LH-RH (leuprorelin, goserelin, v.v.), estramustin-phosphat, chất đối kháng estrogen (tamoxifen, raloxifen, v.v.), và chất ức chế aromataza (anastrozol, letrozol, exemestan, v.v.). Tuy nhiên, ví dụ về chất điều trị ung thư không được giới hạn ở các dược chất được mô tả ở trên, miễn là các chất này hoạt tính trị khối u.

Đối tượng làm đích để sử dụng là không được giới hạn cụ thể. Tốt hơn, nếu đối tượng này là động vật có vú, và tốt hơn là người.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa, hoặc để sử dụng hấp thụ qua đường dạ dày-ruột bao gồm sử dụng qua đường miệng. Thành phần và nồng độ của chế phẩm có thể được xác định tùy theo phương pháp sử dụng. Liên quan đến ái lực của kháng thể kháng GARP bao gồm trong dược phẩm theo sáng chế đối với GARP, tức là, hằng số phân ly (giá trị K_d) của kháng thể kháng GARP đối với GARP, khi ái lực tăng (tức là, giá trị K_d thấp), dược phẩm có thể biểu hiện các tác dụng dược lý, ngay cả khi liều áp dụng của nó cho người giảm. Trên cơ sở các kết quả này, liều áp dụng của dược phẩm theo sáng chế cho người có thể cũng được xác định. Khi loại kháng thể kháng GARP được sử dụng cho người, kháng thể có thể được sử dụng ở liều 0,001 đến 100 mg/kg một lần hoặc vài lần các khoảng thời gian 1 đến 180 ngày. Ví dụ về dạng dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm thuốc tiêm bao gồm thuốc truyền nhỏ giọt, thuốc đạn, chất dùng qua đường mũi, chất dùng dưới lưỡi, và chất hấp thụ qua da.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể trong các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong các ví dụ này, trừ khi có quy định khác, các thao tác cụ thể liên quan đến thao tác di truyền đã được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., xuất bản bởi Cold Spring Harbor Laboratory Press năm 1989) hoặc các phương pháp khác được mô tả trong cẩm nang phòng thí nghiệm được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sử dụng, hoặc khi các thuốc thử hoặc kit có bán trên thị trường đã được sử dụng, các ví dụ đã

được thực hiện theo các hướng dẫn bao gồm trong các sản phẩm có bán trên thị trường.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể trong các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Thu kháng thể

1)-1 Tách Fab kháng GARP bằng cách đái trong phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn

Ngân hàng thể thực khuẩn n-CoDeR Fab (BioInvent) được sử dụng để tách Fab liên kết với GARP bằng cách sử dụng thuốc thử EZ-Link NHS-Chromogenic-Biotin (Thermo Scientific), GARP (R&D Systems) được biotiny hóa. Để đái pha lỏng, GARP đã biotiny hóa được dùng làm pha rắn trên Dynabeads Streptavidin M-280 (Life Technologies), và tiếp theo các thể thực khuẩn được thêm vào. Các thể thực khuẩn không liên kết được loại bỏ bằng thao tác rửa bằng cách sử dụng nam châm (DynaMag-2, Life Technologies). Sau đó, các thể thực khuẩn liên kết với GARP được thu bằng cách xử lý chúng bằng trypsin (Sigma-Aldrich), và tiếp theo khuếch đại bằng cách sử dụng *Escherichia coli*. Tổng cộng, các thao tác đái được thực hiện ba lần, và, bằng cách sử dụng các enzym giới hạn, đoạn ADN mã hóa Fab được cắt ra khỏi phagemid đa dòng, và tiếp theo nạp lên vector biểu hiện đối với *Escherichia coli*. Sau đó, *Escherichia coli* TOP10F' (Life Technologies) được biến nạp bằng vector biểu hiện này, và Fab tiếp theo được biểu hiện với sự có mặt của IPTG (Sigma-Aldrich). Fab thu được được dùng cho việc sàng lọc bằng ELISA.

1)-2 Sàng lọc Fab liên kết với GARP bằng ELISA

50 μ L GARP, đã được pha loãng tới 2 μ g/mL bằng PBS (0,01 M nước muối đệm phosphat (pH 7,4) chứa 0,138 M natri clorua và 0,0027 M kali clorua; Sigma-Aldrich), được thêm vào mỗi lỗ của đĩa 384 lỗ Maxi-sorp (Black, Nunc), và tiếp theo nó được ủ qua đêm ở 4°C để phủ đĩa. Theo cách khác, 50 μ L NeutrAvidin (Life Technologies) đã được pha loãng tới 1 μ g/mL bằng PBS được thêm vào đĩa 384 lỗ Maxi-sorp này để phủ đĩa (bằng cách ủ qua đêm ở 4°C). Sau đó, đĩa được rửa bằng đệm ELISA (PBS (Sigma-Aldrich) có bổ sung 0,05% Tween-20 (Bio-RAD)) ba lần, và GARP đã biotiny hóa tiếp theo được thêm vào (1 pmol/50 μ L PBS/lỗ), tiếp theo ủ

ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ kèm theo trộn. Đĩa được rửa bằng đệm ELISA ba lần, tiếp theo phong bế bằng Blocker Casein (Thermo Scientific), và được rửa tiếp bằng đệm ELISA ba lần. Sau đó, dịch nổi nuôi cấy chứa Fab được sản xuất bởi *Escherichia coli* được thêm vào, và sau đó đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ kèm theo trộn. Đĩa được rửa bằng đệm ELISA ba lần, và 50 μ L kháng thể kháng F(ab')₂ người đã đánh dấu peroxidaza cải ngựa (Horseradish peroxidase: HRP) đã pha loãng 2500 lần (R&D Systems) được thêm vào. Đĩa được ủ tiếp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ kèm theo trộn. Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng đệm ELISA ba lần, và cơ chất SuperSignal Pico ELISA Chemiluminescent (Thermo Scientific) tiếp theo được thêm vào các lỗ. Mười phút sau, phát quang hóa học được đo bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (Envision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer), và Fab liên kết với GARP được phân lập.

1)-3 Xác định trình tự nucleotit của dòng dương tính với ELISA

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các dòng dương tính với ELISA (105F và 110F) được phân tích bằng phương pháp Dye Terminator (BigDye (nhãn hiệu đã đăng ký) Terminator v3.1, Life Technologies). Trình tự của các môi chính được sử dụng để xác định trình tự là như sau.

Môi A: 5'-GAA ACA GCT ATG AAA TAC CTA TTG C-3' (SEQ ID NO: 10)

Môi B: 5'-GCC TGA GCA GTG GAA GTC C-3' (SEQ ID NO: 11)

Môi C: 5' -TAG GTA TTT CAT TAT GAC TGT CTC-3' (SEQ ID NO: 12)

Môi D: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3' (SEQ ID NO: 13)

Bằng phân tích được mô tả ở trên, trình tự nucleotit của vùng biến đổi của các gen kháng thể 105F và kháng thể 110F được xác định.

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 105F là trình tự gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 354 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, và trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 105F là trình tự gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 336 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự.

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 110F là trình tự gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 369 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự, và trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 110F là trình tự gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 1 đến 333 trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự.

1)-4: Điều chế IgG có chiều dài đầy đủ, và biểu hiện và tinh chế IgG

IgG có chiều dài đầy đủ của các dòng dương tính với ELISA bao gồm 105F và 110F được điều chế bằng phương pháp sau.

Trình tự nucleotit mã hóa Fab được xác định, và sau đó, trình tự nucleotit tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mỗi kháng thể cụ thể trong 1)-3 ở trên được xác định.

Theo phương pháp chung, trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng được mô tả ở trên được gắn với trình tự nucleotit mã hóa vùng ổn định của chuỗi nặng của IgG₁ người (CH1 + vùng Fc: trình tự axit amin tại các vị trí 119 đến 448 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự), và cũng, trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được mô tả ở trên được gắn với trình tự nucleotit mã hóa vùng ổn định của chuỗi nhẹ của IgG₁ người (CL: trình tự axit amin tại các vị trí 113 đến 217 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự). Sau đó, sản phẩm gắn thu được được cài vào vector biểu hiện đối với tế bào động vật, như pcADN3.3 (Invitrogen), để cấu trúc vector biểu hiện IgG đối với tế bào động vật.

Trình tự nucleotit của vector biểu hiện IgG đã cấu trúc lại được phân tích, để xác nhận được rằng trình tự nucleotit của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể 105F là trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, và rằng trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể 105F là trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự.

Cũng xác nhận được rằng trình tự nucleotit của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể 110F là trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình

tự, và rằng trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể 110F là trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự.

Hơn nữa, trên cơ sở trình tự nucleotit được mô tả ở trên, các trình tự axit amin của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể 105F được mã hóa bởi trình tự nucleotit, và trình tự axit amin của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể 110F được mã hóa bởi trình tự nucleotit, được xác định.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 105F là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của nó là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 110F là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của nó là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự.

IgG của kháng thể 105F hoặc kháng thể 110F được biểu hiện tạm thời bằng cách cài vectơ biểu hiện IgG được mô tả ở trên đối với tế bào động vật vào tế bào FreeStyle 293F (Life Technologies), và tiếp theo các IgG thu được được tinh chế bằng cách sử dụng cột Protein A Affinity (HiTrap Mab Select SuRe, GE Healthcare), nếu cần. Sau đó, đệm trong đó IgG được hòa tan được thay bằng PBS bằng cách sử dụng Vivaspın 20 (7k MWCO, GE Healthcare) và sản phẩm tiếp theo được dùng cho bước tiếp theo "1)-5."

1)-5 Xác nhận sự liên kết của IgG đã tinh chế với GARP theo ELISA

100 μ L GARP người (R&D Systems, số catalog: 6055-LR) pha loãng đến 1 μ g/mL bằng PBS được thêm vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ Maxi-sorp (Black, Nunc), và sau đó đĩa được ủ qua đêm ở 4°C để phủ đĩa.

Đĩa được rửa bằng đệm ELISA ba lần, và tiếp theo phong bế bằng Blocker Casein ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng đệm ELISA ba lần, và 100 μ L gồm 50 nM kháng thể 105F, 50 nM kháng thể 110F, 50 nM IgG người (Jackson Immuno Research), 50 nM kháng thể chuột kháng GARP (Plato-1, ENZO Life Science) hoặc 50 nM IgG chuột (Jackson Immuno Research) được thêm vào các lỗ, và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ kèm theo trộn.

Đĩa được rửa bằng đệm ELISA ba lần. Sau đó, 100 μ L kháng thể kháng Fc người đã đánh dấu HRP (R&D Systems), kháng thể này đã được pha loãng 5000 lần bằng PBS, được thêm vào các lỗ đã xử lý bằng kháng thể 105F, kháng thể 110F hoặc IgG người. Mặt khác, 100 μ L kháng thể kháng Fc chuột đã đánh dấu HRP (R&D Systems), kháng thể này đã được pha loãng 5000 lần bằng PBS, được thêm vào các lỗ đã xử lý bằng kháng thể chuột kháng GARP và IgG chuột. Đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ kèm theo trộn.

Đĩa được rửa bằng đệm ELISA năm lần, và 0,1 mL cơ chất SuperSignal Pico ELISA Chemiluminescent tiếp theo được thêm vào các lỗ. Mười phút sau, phát quang hóa học được đo bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (Envision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer).

Kết quả là, chứng minh được rằng kháng thể 105F và kháng thể 110F liên kết với GARP (Fig.10) giống như kháng thể kháng GARP có bán trên thị trường.

Ví dụ 2: Liên kết với tế bào biểu hiện gen kháng nguyên

Về vector biểu hiện GARP, dòng cADN của GARP người (Origene) được mua, và tiếp theo nó được nhân dòng trong vector pcADN3.1 (+) (Invitrogen) theo phương pháp chung. Sau đó, trình tự nucleotit của nó được xác nhận.

Vector biểu hiện GARP và vector pcADN3.1 dùng làm đối chứng mỗi vector này được chuyển nhiễm vào tế bào HEK-293T (ATCC: CRL-11268), bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Các tế bào thu được được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Invitrogen) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS, Hyclone) qua đêm trong 5% CO₂ ở 37°C. Sau đó, tế bào được thu hoạch từ đĩa bằng cách xử lý TrypLE Express (Invitrogen), và tế bào được rửa bằng đệm MACS (PBS chứa 0,5% BSA và 2mM EDTA; Miltenyi Biotec) hai lần và tiếp theo được tạo huyền phù trong cùng dung dịch được mô tả ở trên. Kháng thể 105F và IgG người đối chứng (ENZO Life Science) mỗi loại được thêm vào huyền phù tế bào, và tế bào được ủ trong 15 phút ở 4°C. Tế bào được rửa hai lần bằng đệm MACS. Kháng thể kháng IgG đã đánh dấu fluorescein isothiocyanat (Fluorescein isothiocyanate: FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được thêm vào và được tạo huyền phù, và tế bào được ủ tiếp ở 4°C trong 15 phút. Tế bào được rửa hai lần bằng đệm MACS, và tiếp theo tế

bào được cố định bằng 1% PFA (điều chế từ dung dịch Paraformaldehyde 32% (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES)), và được đo bằng cách sử dụng bào kế dạng dòng (FACS Canto II; Becton Dickinson). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng FlowJo (TreeStar). Tế bào chết được loại khỏi quá trình phân tích bằng cách cho qua cổng các tế bào nhuộm Horizon FVS450 (Becton Dickinson). Sau đó, sơ đồ cường độ huỳnh quang FITC của tế bào sống được tạo ra.

Về tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm vector đối chứng một mình, sơ đồ cường độ huỳnh quang đối với kháng thể 105F là giống với sơ đồ đối với IgG đối chứng. Mặt khác, về tế bào HEK-293T biểu hiện GARP, xác nhận được rằng sơ đồ đối với kháng thể 105F chuyển dịch về phía cường độ huỳnh quang mạnh, so với sơ đồ đối với IgG đối chứng (Fig.11). Từ các kết quả nêu trên, phát hiện ra rằng kháng thể 105F liên kết đặc hiệu với GARP được biểu hiện bởi tế bào HEK-293T.

Ví dụ 3: Liên kết với tế bào biểu hiện GARP nội sinh

3)-1 Phân tích bào kế dạng dòng bằng cách sử dụng tế bào L428

Dạng đánh dấu huỳnh quang của kháng thể 105F được điều chế bằng cách sử dụng kit đánh dấu kháng thể đơn dòng Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Tế bào L428 (thu được từ DSMZ) được rửa hai lần bằng đệm MACS, và được tạo huyền phù trong cùng loại dung dịch. Kháng thể đã đánh dấu 105F được thêm vào huyền phù tế bào, và ủ tế bào trong 30 phút ở 4°C. Tế bào được rửa hai lần bằng đệm MACS, và tiếp theo tế bào được cố định bằng 1% PFA, và được đo bằng cách sử dụng bào kế dạng dòng (FACS Canto II, Becton Dickinson). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng FlowJo (TreeStar). Tế bào chết được loại khỏi quá trình phân tích bằng cách cho qua cổng các tế bào nhuộm Horizon FVS450. Sau đó, sơ đồ cường độ huỳnh quang FITC của tế bào sống được tạo ra. So với sơ đồ cường độ huỳnh quang đối với tế bào L428 một mình, sơ đồ của tế bào L428 mà kháng thể 105F đã được thêm vào chuyển dịch về phía cường độ huỳnh quang mạnh. Do đó, xác nhận được rằng kháng thể 105F đã liên kết với GARP được biểu hiện nội sinh bởi tế bào này (Fig.12).

3)-2 Phân tích bào kế dạng dòng bằng cách sử dụng Treg người

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cell: PBMC) từ đối tượng khỏe mạnh được tách ra bằng cách sử dụng Ficoll-Paque PLUS (GE

Healthcare), và tế bào đã tách tiếp theo được cấy với lượng 2×10^6 tế bào/mL trong môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS (sau đây gọi là "môi trường RP-F10") trong đĩa 24 lỗ có độ dính bám thấp (Costar). Kháng thể kháng CD3 (BD Pharmingen) và kháng thể kháng CD28 (BD Pharmingen) được thêm vào các lỗ, và tế bào được nuôi cấy trong 20 giờ. Sau đó, tế bào được tạo huyền phù trong đệm FACS (HBSS (Invitrogen) có bổ sung 10 mM HEPES (Invitrogen), 2 mM EDTA (Invitrogen), và 2%FBS), và kháng thể 105F đã đánh dấu điều chế được trong mục 3)-1 ở trên và kháng thể kháng GARP đã đánh dấu Alexa Fluor 647 (G14D9, eBioscience) được thêm vào huyền phù. Tế bào được ủ trên băng trong 30 phút. Tế bào được rửa bằng đệm FACS, và dung dịch làm việc Fixation/Permeabilization (eBioscience) được thêm vào. Tế bào được ủ tiếp trên băng trong 30 phút, và tế bào được rửa bằng đệm Permeabilization (eBioscience). Sau đó, 2% huyết thanh chuột cống (eBioscience) được thêm vào tế bào. Tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và kháng thể kháng Foxp3 đã đánh dấu PE (eBioscience) được thêm vào, tiếp theo ủ tiếp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Tế bào được rửa và cố định bằng dung dịch cố định mô được điều chế bằng cách pha loãng hai lần dung dịch đệm 4% Paraformaldehyt phosphat (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) với D-PBS (Invitrogen) ở 4°C trong 15 phút hoặc lâu hơn. Sau khi tế bào được rửa bằng đệm FACS, tế bào được đo bằng cách sử dụng bào kế dạng dòng (FACS Canto II; Becton Dickinson) và phân tích bằng cách sử dụng FlowJo (Tree Star). Kết quả là, kháng thể 105F đã liên kết với Treg dương tính với FoxP3 giống như kháng thể kháng GARP có bán trên thị trường (Fig.13).

Ví dụ 4: Các đặc tính của kháng thể kháng GARP

4)-1 Hoạt tính ADCC

4)-1-1 Điều chế tế bào tác động

PBMC người đóng băng (Cellular Technology) được làm tan băng theo quy trình. Tế bào NK được tinh chế từ PBMC này, bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào NK (Miltenyi Biotec). Tế bào NK thu được được ủ qua đêm trong môi trường RP-F10 có bổ sung 100 IU/mL rhIL-2 (Novartis). Sau đó, số lượng tế bào sống được đếm bằng thử nghiệm loại trừ thuốc nhuộm xanh trypan, và sau đó tế bào được tạo huyền phù lại

trong môi trường RP-F10 ở mật độ tế bào 2×10^5 tế bào/mL. Tế bào thu được được dùng làm tế bào tác động.

4)-1-2 Điều chế tế bào đích

30 μ L (1110 kBq) Crom-51 (^{51}Cr) được trộn với $0,6 \times 10^6$ tế bào L428 được mô tả trong Ví dụ 3)-1, trong môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS, và tế bào được ủ trong 2 giờ trong 5% CO_2 ở 37°C , để tế bào được đánh dấu phóng xạ. Tế bào đã đánh dấu được rửa ba lần bằng môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS, và tiếp theo tế bào được tạo huyền phù lại trong cùng môi trường với lượng 4×10^4 tế bào/mL. Tế bào thu được được dùng làm tế bào đích.

4)-1-3 Thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr

Kháng thể 105F, đã được pha loãng bằng môi trường RP-F10 để nồng độ cuối có thể ở 1, 10, 100, hoặc 1000 ng/mL, được phân tán với lượng 50 μ L/lỗ trong vi đĩa đáy chữ U 96-lỗ (Costar), và tế bào đích được thêm vào các lỗ (50 μ L/lỗ). Đĩa ủ ở 4°C trong 30 phút. Tiếp theo, tế bào tác động được thêm vào các lỗ (100 μ L/lỗ), và đĩa ủ trong 5% CO_2 ở 37°C trong 4 giờ. Sau đó, 50 μ L/lỗ dịch nổi được thu và nạp lên LumaPlate (PerkinElmer), và liều tia gama giải phóng được đo bằng cách sử dụng máy đếm gama. Tỷ lệ làm tan tế bào gây ra do hoạt tính ADCC được tính theo công thức sau.

$$\text{Tỷ lệ làm tan tế bào (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Số đếm lỗ mẫu

B: Giá trị trung bình ($n = 3$) số đếm giải phóng tự phát (lỗ không có kháng thể và tế bào tác động). Sau khi thêm kháng thể và sau khi thêm tế bào tác động, 50 μ L và 100 μ L môi trường RP-F10 lần lượt được thêm vào. Các thao tác tương tự như đối với lỗ mẫu được thực hiện không phải ở trên.

C: Giá trị trung bình ($n = 3$) số đếm giải phóng cực đại (lỗ trong đó tế bào đích được hòa tan với chất hoạt động bề mặt). Sau khi thêm kháng thể, 50 μ L môi trường RP-F10 được thêm vào. Sau khi thêm tế bào tác động, 100 μ L môi trường RP-F10 có bổ sung 2% (theo thể tích) Triton-X100 (Sigma) được thêm vào. Các thao tác tương tự như đối với lỗ mẫu được thực hiện không phải ở trên.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.14. Kháng thể 105F biểu hiện hoạt tính làm tan tế bào đối với tế bào L428 theo cách phụ thuộc nồng độ kháng thể. Mặt khác, IgG người đối chứng không biểu hiện hoạt tính làm tan tế bào như vậy. Do đó, kháng thể 105F có hoạt tính ADCC đối với tế bào L428 biểu hiện GARP nội sinh. Cần lưu ý rằng các kháng thể IgG1 người kháng GARP (MHG8 và LHG10) sản xuất được trên cơ sở thông tin trình tự được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1 không biểu hiện hoạt tính ADCC.

4)-2 Hoạt tính ức chế chức năng Treg

4)-2-1 Điều chế Treg, Teff (tế bào T tác động: tế bào T giúp CD4-dương tính CD25-âm tính), và tế bào phụ

Tế bào T CD4-dương tính được tách từ PBMC điều chế được theo cách giống như trong mục 4)-1-1, bằng cách sử dụng CD4 T cell ISOLATION Kit (Miltenyi Biotec), và kháng thể kháng CD4 đánh dấu FITC (Miltenyi Biotec) và kháng thể kháng CD25 đánh dấu APC (Miltenyi Biotec) được thêm vào tế bào T CD4-dương tính. Tế bào này được ủ ở 4°C trong 30 phút. Sau khi tế bào được rửa, tế bào được tạo huyền phù trong đệm MACS, và tế bào CD4-dương tính CD25-âm tính (Teff) và tế bào CD4-dương tính CD25-dương tính mạnh (Treg) được tách bằng cách sử dụng FACS Aria IIu (Becton Dickinson).

Mặt khác, tế bào CD3-dương tính được lấy ra từ PBMC bằng cách sử dụng CD3 Microbeads (Miltenyi Biotec) và tế bào này được chiếu xạ ở liều 1 C/kg (liều hấp thụ: 38,76 Gy/kg (3876 Rad/kg)) bằng cách sử dụng thiết bị chiếu xạ tia X (Hitachi Medical Corporation) để điều chế tế bào phụ.

4)-2-2 Phương pháp nuôi cấy đồng thời và thử nghiệm hoạt tính ức chế chức năng Treg

Về môi trường nuôi cấy, môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung Penicillin và Streptomycin (Invitrogen), 1 × MEM NEAA (Invitrogen), 1 × Natri pyruvat (Invitrogen), 5 mM Hepes và 5% huyết thanh AB nam giới (Sigma) được sử dụng. Teff (2000 tế bào/lỗ) và tế bào phụ (20000 tế bào/lỗ) được trộn và thêm vào mỗi lỗ của vi đĩa đáy chữ U 96-lỗ, và Treg được thêm tiếp và cấy vào lỗ ở 500 tế bào/lỗ. Ngoài ra, lỗ đối chứng không có Treg cũng được điều chế. Kháng thể kháng CD3,

kháng thể kháng CD28, và kháng thể 105F được thêm vào các lỗ ở nồng độ cuối 50 hoặc 10 $\mu\text{g/mL}$, và đĩa ủ trong 5 ngày trong 5% CO_2 ở 37°C. Sau đó, [^3H]-thymidin (PerkinElmer) ở 18,5 kBq/mL được điều chế, và thêm vào mỗi lỗ ở 20 $\mu\text{L/lỗ}$. Tế bào được ủ tiếp trong 18 giờ. Tế bào được thu hoạch trong Filtermat A (PerkinElmer) bằng cách sử dụng dụng cụ thu hoạch tế bào (Mach II, Tomtech), và hoạt tính phóng xạ [^3H]-thymidin hợp nhất vào tế bào được đo bằng cách sử dụng máy đếm nhấp nháy (MicroBeta, PerkinElmer). Dữ liệu đo được biểu diễn dưới dạng số đếm đã hiệu chỉnh/phút (CCPM).

Các kháng thể IgG1 người kháng GARP (MHG8 và LHG10) sản xuất được trên cơ sở thông tin trình tự được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1 cũng được dùng cho hệ thống thí nghiệm này.

4)-2-3 Đo hoạt tính ức chế

Giá trị trung bình của ba lỗ trong các điều kiện nuôi cấy đồng thời riêng rẽ được tính. Giá trị tăng sinh giảm trong nuôi cấy đồng thời Teff với Treg khi so sánh với Teff một mình, được xác định là "Tỷ lệ ức chế tăng sinh Teff gây ra do Treg" ($= 1 - [\text{CCPM của nuôi cấy đồng thời/CCPM của Teff một mình}]$).

Hoạt tính ức chế của mỗi kháng thể đối với chức năng Treg được xác định bằng cách lấy tỷ lệ ức chế sự tăng sinh Teff bởi Treg khi không có mặt kháng thể trừ đi tỷ lệ ức chế khi có kháng thể ($= [\text{tỷ lệ ức chế khi không thêm kháng thể}] - [\text{tỷ lệ ức chế sau khi thêm mỗi kháng thể}]$). Cần lưu ý rằng hoạt tính ức chế này của mẫu được tính mỗi lần trong mỗi thí nghiệm.

Kết quả về hoạt tính ức chế của kháng thể 105F đối với chức năng Treg ở 50 $\mu\text{g/mL}$ (tỷ lệ ức chế: 72,6%) được thể hiện trên Fig.15, và kết quả về kháng thể 105F và các kháng thể MHG-8 và LHG-10 (10 $\mu\text{g/mL}$ mỗi kháng thể) được thể hiện trên Fig.16. Các kháng thể MHG-8 và LHG-10 không có hoạt tính ức chế đối với chức năng Treg (tỷ lệ ức chế lần lượt là: 0,8% và 0,0%), trong khi kháng thể 105F ức chế đáng kể chức năng Treg (tỷ lệ ức chế: 65,8%). Tỷ lệ ức chế gây ra do việc tải nạp siARN đối với GARP vào Treg là khoảng 15%, khi tính xấp xỉ bằng cách sử dụng các giá trị trên Fig.5A ($\text{CD4} + \text{CD25} - (\text{Teff}) : \text{Treg} = 4 : 1$) của Tài liệu phi sáng chế 10. Ví dụ 5: Sản xuất kháng thể chuột cống

5)-1 Điều chế vector biểu hiện GARP

Vector biểu hiện được mô tả trong Ví dụ 2 được sử dụng làm vector biểu hiện GARP, và EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN) được sử dụng để sản xuất khối.

5)-2 Gây miễn dịch cho chuột cống

Để gây miễn dịch, chuột cống đực WKY/Izm (Japan SLC, Inc.) được sử dụng. Trước tiên, các chi sau của mỗi chuột cống được xử lý sơ bộ bằng Hyaluronidase (SIGMA-ALDRICH) và vector biểu hiện GARP được tiêm qua đường trong cơ vào cùng vị trí. Tiếp theo, bằng cách sử dụng ECM830 (BTX), biến nạp điện *in vivo* được thực hiện trên cùng vị trí bằng cách sử dụng điện cực hai kim. Cứ hai tuần một lần, biến nạp điện *in vivo* này được lặp lại, và các hạch bạch huyết hoặc lách được lấy từ chuột cống, và được sử dụng để sản xuất tế bào lai.

5)-3 Sản xuất tế bào lai

Các hạch bạch huyết hoặc tế bào lách được dung hợp với tế bào u tủy chuột nhắt SP2/0-ag14 (ATCC, No.CRL-1581) bằng dung hợp tế bào nhờ điện, bằng cách sử dụng LF301 Cell Fusion Unit (BEX), và sau đó tế bào được pha loãng bằng ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies) và ủ. Các khuẩn lạc tế bào lai xuất hiện trong môi trường nuôi cấy được lấy và chọn làm tế bào lai đơn dòng. Mỗi khuẩn lạc tế bào lai được nuôi cấy, và dịch nổi nuôi cấy từ mỗi khuẩn lạc tế bào lai được sử dụng để sàng lọc tế bào lai sản xuất kháng thể kháng GARP.

5)-4 Sàng lọc kháng thể theo phương pháp ELISA tế bào

5)-4-1 Điều chế tế bào biểu hiện gen kháng nguyên để dùng trong phương pháp ELISA tế bào

Tế bào 293 α (dòng tế bào biểu hiện ổn định được tạo ra từ tế bào HEK-293 (ATCC: CRL-1573) biểu hiện integrin α v và integrin β 3) được điều chế ở $7,5 \times 10^5$ tế bào/mL trong môi trường DMEM (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS. Quy trình tải nạp bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Life Technologies), vector biểu hiện GARP hoặc vector pcADN3.1 (+) dùng làm đối chứng âm tính được chuyển nhiễm vào tế bào, và tế bào này được phân tán với lượng 50 μ l vào đĩa 96 lỗ bán diện tích (Corning). Sau đó, tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS trong 24 đến

27 giờ trong 5% CO₂ ở 37°C. Tế bào chuyển nhiễm thu được được sử dụng cho thử nghiệm ELISA tế bào (Cell-ELISA) ở trạng thái dính bám.

5)-4-2 Thử nghiệm ELISA tế bào

Dịch nổi nuôi cấy của tế bào 293 α được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện điều chế được trong Ví dụ 5)-4-1 được loại bỏ, và dịch nổi nuôi cấy từ mỗi tế bào lai được thêm vào tế bào 293 α được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện GARP hoặc bằng vector pcADN3.1 (+). Tế bào được ủ ở 4°C trong 1 giờ. Tế bào trong lỗ được rửa một lần bằng PBS (+) có bổ sung 5% FBS, và sau đó, kháng thể Peroxidaza kháng IgG chuột cống sản xuất ở thỏ (SIGMA) đã pha loãng 500 lần bằng PBS (+) có bổ sung 5% FBS được thêm vào lỗ. Tế bào được ủ ở 4°C trong 1 giờ. Tế bào trong lỗ được rửa ba lần bằng PBS (+) có bổ sung 5% FBS, và dung dịch tạo màu OPD (được điều chế bằng cách hòa tan o-phenylendiamin dihydroclorua (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và H₂O₂ trong dung dịch OPD (0,05 M trinitrat, 0,1 M dinatri hydro phosphat 12-nước; pH 4,5), để các chất lần lượt thành 0,4 mg/ml và 0,6% (theo thể tích)) được thêm vào với lượng 50 μ l/lỗ vào lỗ. Trong khi đĩa ủ kèm theo trộn một lúc, phản ứng tạo màu được thực hiện. Sau đó, HCl 1M được thêm vào đĩa (50 μ l/lỗ) để kết thúc phản ứng tạo màu, và độ hấp thụ ở 490 nm được đo bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (ENVISION: PerkinElmer). Để chọn tế bào lai sản xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với GARP người được biểu hiện trên bề mặt của màng tế bào, tế bào lai sản xuất dịch nổi nuôi cấy biểu hiện độ hấp thụ cao ở tế bào 293 α được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện GARP so với ở tế bào được chuyển nhiễm bằng vector pcADN3.1 (+) đối chứng được chọn làm tế bào dương tính sản xuất kháng thể kháng GARP người.

5)-5 Sàng lọc kháng thể theo phương pháp bào kế dạng dòng

5)-5-1 Điều chế tế bào biểu hiện gen kháng nguyên để dùng trong phân tích bào kế dạng dòng

Tế bào HEK-293T (thu được từ ATCC) được cấy vào bình 225-cm² (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) với lượng 5×10^4 tế bào/cm², và sau đó tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS qua đêm trong 5% CO₂ ở 37°C. Vào ngày tiếp theo, tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện GARP hoặc vector pcADN3.1 (+) dùng làm đối chứng âm tính bằng cách sử dụng Lipofectamine

2000, và tế bào được ủ tiếp qua đêm trong 5% CO₂ ở 37°C. Vào ngày tiếp theo, tế bào HEK-293T đã chuyển nhiễm được xử lý bằng TrypLE Express (Life Technologies), được rửa bằng môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS, và được tạo huyền phù lại trong PBS có bổ sung 5% FBS. Tế bào huyền phù thu được được sử dụng trong phân tích bào kế dạng dòng.

5)-5-2 Phân tích bào kế dạng dòng

Tính đặc hiệu liên kết với GARP người của kháng thể sản xuất được từ tế bào lai đã được xác định là dương tính bởi thử nghiệm ELISA tế bào trong Ví dụ 5)-4-2 còn được xác định bằng Phân tích bào kế dạng dòng.

Huyền phù chứa tế bào HEK-293T biểu hiện tạm thời điều chế được trong Ví dụ 5)-5-1 được ly tâm, và tiếp theo dịch nổi được loại bỏ. Sau đó, dịch nổi nuôi cấy từ mỗi tế bào lai được thêm vào tế bào và được tạo huyền phù. Tế bào được ủ ở 4°C trong 1 giờ. Tế bào được rửa hai lần bằng PBS có bổ sung 5% FBS, và IgG kháng chuột chống liên hợp với FITC (SIGMA) đã pha loãng 500 lần bằng PBS có bổ sung 5% FBS được thêm vào tế bào và được tạo huyền phù. Tế bào được ủ ở 4°C trong 1 giờ. Tế bào được rửa hai lần bằng PBS có bổ sung 5% FBS, và tiếp theo được tạo huyền phù lại trong PBS có bổ sung 5% FBS và 2 µg/ml 7-aminoactinomycin D (Molecular Probes). Tế bào được đo bằng cách sử dụng bào kế dạng dòng (FC500: được sản xuất bởi Beckman Coulter). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Flowjo (TreeStar). Sau khi tế bào chết được loại khỏi phân tích bằng cách cho qua cổng tế bào dương tính với 7-Aminoactinomycin D, sơ đồ cường độ huỳnh quang FITC của tế bào sống được tạo ra. Tế bào lai sản xuất các kháng thể liên kết với GARP người (113 dòng) được chọn trên cơ sở các kết quả mà trong đó sơ đồ đối với kháng thể dịch chuyển về phía cường độ huỳnh quang mạnh trong tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện GARP so với tế bào được chuyển nhiễm bằng vector pcADN3.1 đối chứng.

5)-6 Điều chế kháng thể đơn dòng

5)-6-1 Nuôi cấy tế bào lai 151D và 198D

Từ tế bào lai sản xuất kháng thể chuột chống GARP người thu được trong mục 5)-5-2 ở trên, các tế bào lai 151D và 198D, mà đã được cho là liên kết mạnh với GARP người, được chọn.

Kháng thể đơn dòng chuột chống GARP được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào lai.

Trước tiên, thể tích tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng GARP gia tăng đầy đủ với ClonaCell-HY Selection Medium E, và sau đó, môi trường này được đổi bằng Hybridoma SFM (Life Technologies) là môi trường mà 20% Ultra Low IgG FBS (Life Technologies) đã được thêm vào. Sau đó, tế bào lai (8 đến 9×10^7 tế bào) được cấy vào bình 1272-cm² (Corning), và tiếp theo nuôi cấy trong 7 ngày. Dịch nổi nuôi cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm, và nó được khử trùng bằng cách cho qua bộ lọc 0,8- μ m, và qua bộ lọc 0,45- μ m (Corning).

5)-6-2 Tinh chế kháng thể đơn dòng

Kháng thể được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào lai điều chế được trong Ví dụ 5)-6-1 theo sắc ký ái lực Protein G. Kháng thể được hấp phụ lên cột Protein G (GE Healthcare Bioscience), tiếp theo cột này được rửa bằng PBS, và kháng thể tiếp theo được giải hấp bằng dung dịch nước 0,1 M glyxin/HCl (pH 2,7). 1 M Tris-HCl (pH 9,0) được thêm vào nước giải hấp, để pH được điều chỉnh đến pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5. Sau đó, dung dịch được thẩm tách (Thermo Scientific, Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), để đệm được thay bằng PBS. Bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc ly tâm VIVASPIN20 (ngưỡng trọng lượng phân tử: UF30K, Sartorius), kháng thể được cô, để nồng độ của kháng thể được điều chỉnh đến 0,7 mg/mL hoặc lớn hơn. Cuối cùng, kháng thể được lọc qua bộ lọc Minisart-Plus (Sartorius) để thu mẫu đã tinh chế.

Ví dụ 6: Nhân dòng kháng thể chuột chống và sản xuất kháng thể người dạng khảm

6)-1 Nhân dòng và xác định trình tự cADN của kháng thể chuột chống 151D

6)-1-1 Điều chế ARN tổng số từ tế bào lai sản xuất 151D

Để khuếch đại cADN bao gồm vùng biến đổi của 151D, ARN tổng số được điều chế từ tế bào lai sản xuất 151D bằng cách sử dụng TRIzol Reagent (Ambion).

6)-1-2 Khuếch đại cADN bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng 151D theo 5'-RACE PCR, và xác định trình tự của nó

cADN bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được khuếch đại bằng cách sử dụng khoảng 1 µg ARN tổng số điều chế được trong Ví dụ 6)-1-1 và SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

Về mỗi dùng để khuếch đại cADN của gen vùng biến đổi của chuỗi nặng 151D theo PCR, UPM (Universal Primer A Mix: bao gồm SMARTer RACE cDNA Amplification Kit) và mỗi được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định của các chuỗi nặng chuột cống đã biết được sử dụng.

cADN bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR được nhân dòng trong plasmid, và sau đó, trình tự nucleotit của cADN của vùng biến đổi của chuỗi nặng được dùng cho phân tích trình tự.

Trình tự nucleotit xác định được của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng 151D được nêu trong SEQ ID NO: 14, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 15.

6)-1-3 Khuếch đại cADN bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 151D theo 5'-RACE PCR, và xác định trình tự của nó

Khuếch đại và xác định trình tự được thực hiện bằng phương pháp giống như được áp dụng trong Ví dụ 6)-1-2. Tuy nhiên, về mỗi dùng để khuếch đại cADN của vùng biến đổi của gen chuỗi nhẹ 151D theo PCR, UPM (Universal Primer A Mix: bao gồm với SMARTer RACE cDNA Amplification Kit) và các mỗi được thiết kế từ trình tự của các vùng ổn định của các chuỗi nhẹ chuột cống đã biết được sử dụng.

Trình tự nucleotit xác định được của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 151D được nêu trong SEQ ID NO: 16, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 17.

6)-2 Nhân dòng và xác định trình tự cADN của kháng thể chuột cống 198D

Các trình tự được xác định bằng phương pháp giống như được áp dụng trong Ví dụ 6)-1.

Trình tự nucleotit xác định được của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng 198D được nêu trong SEQ ID NO: 18, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 19. Trình tự nucleotit xác định được của cADN mã hóa vùng biến

đôi của chuỗi nhẹ 198D được nêu trong SEQ ID NO: 20, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 21.

6)-3 Sản xuất vector biểu hiện kháng thể người dạng khảm

6)-3-1 Cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm pCMA-LK

Đoạn dài khoảng 5,4-kb, đã thu được bằng cách cắt plasmid pcADN3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen) bằng các enzym giới hạn XbaI và PmeI, được liên kết với đoạn ADN bao gồm trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của người nêu trong SEQ ID NO: 22 và trình tự ADN mã hóa vùng ổn định chuỗi κ của người, bằng cách sử dụng In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (CLONTECH), để sản xuất pcADN3.3/LK.

Đơn vị biểu hiện neomycin được loại bỏ khỏi pcADN3.3/LK để cấu trúc pCMA-LK.

6)-3-2 Cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu IgG1 người dạng khảm pCMA-G1

Đoạn ADN, đã thu được bằng cách cắt pCMA-LK bằng XbaI và PmeI để loại bỏ trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ và vùng ổn định chuỗi κ của người từ đó, được liên kết với đoạn ADN bao gồm trình tự tín hiệu chuỗi nặng của người nêu trong SEQ ID NO: 23 và trình tự ADN mã hóa axit amin trong vùng ổn định của IgG1 người, bằng cách sử dụng In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (CLONTECH), để cấu trúc pCMA-G1.

6)-3-3 Cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng người dạng khảm 151D

Bằng cách sử dụng cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng kháng thể chuột công 151D thu được trong Ví dụ 6)-1 làm khuôn, PCR được thực hiện với các mồi được thiết kế cho phương pháp tách dòng In-fusion, để khuếch đại đoạn ADN bao gồm cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng. Bằng cách sử dụng In-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech), đoạn ADN khuếch đại được được cài vào vị trí của pCMA-G1 mà đã được cắt bằng enzym giới hạn BspI, để cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng người dạng khảm 151D.

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng người dạng khảm 151D và trình tự axit amin của chuỗi nặng này lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25.

6)-3-4 Cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm 151D

Bằng cách sử dụng cADN mã hóa vùng biến đổi của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 151D thu được trong Ví dụ 6)-1 làm khuôn, PCR được thực hiện với các môi được thiết kế cho phương pháp tách dòng In-fusion, để khuếch đại đoạn ADN bao gồm cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Bằng cách sử dụng In-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech), đoạn ADN khuếch đại được cài vào vị trí của pCMA-LK mà đã được cắt bằng enzym giới hạn BsiWI, để cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm 151D.

Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ người dạng khảm 151D và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ này lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27.

6)-3-5 Cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng người dạng khảm 198D

Bằng cách sử dụng cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng kháng thể chuột cống 198D thu được trong Ví dụ 6)-2 làm khuôn, vector biểu hiện chuỗi nặng người dạng khảm 198D được cấu trúc bằng phương pháp giống như được áp dụng trong Ví dụ 6)-3-3.

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng người dạng khảm 198D và trình tự axit amin của chuỗi nặng này lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29.

6)-3-6 Cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm 198D

Bằng cách sử dụng cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 198D thu được trong Ví dụ 6)-2 làm khuôn, vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm 198D được cấu trúc bằng phương pháp giống như được áp dụng trong Ví dụ 6)-3-4.

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ người dạng khảm 198D và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ này lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31.

6)-4 Điều chế kháng thể người dạng khảm

6)-4-1 Sản xuất kháng thể người dạng khảm

Theo cẩm nang, tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen) được nuôi cấy và cấy chuyển. 1×10^8 tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen) trong pha sinh trưởng logarit được cấy lên vào bình 250-mL Fernbach Erlenmeyer Flask (CORNING), và tiếp theo được pha loãng bằng môi trường biểu hiện FreeStyle293 (Invitrogen) đến mật độ $2,0 \times 10^6$ tế bào/mL.

Trong khi đó, 20 µg vector biểu hiện chuỗi nặng, 30 µg vector biểu hiện chuỗi nhẹ và 150 µg Polyetylenimin (Polyscience #24765) được thêm vào 5 mL môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen), và hỗn hợp thu được được khuấy nhẹ. Sau 5 phút ủ, hỗn hợp được thêm vào tế bào FreeStyle 293F.

Tế bào được ủ trong thiết bị ủ (37°C, 8% CO₂) có lắc ở 125 vòng/phút trong 4 giờ, và sau đó, 50 mL môi trường EX-CELL VPRO (SAFC Biosciences), 0,36 mL GlutaMAX I (GIBCO), và 2,5 mL Yeastolate Ultrafiltrate (GIBCO) được thêm vào môi trường nuôi cấy. Tế bào được ủ tiếp trong thiết bị ủ (37°C, 8% CO₂) có lắc ở 125 vòng/phút trong 7 ngày. Dịch nổi nuôi cấy được thu hoạch và lọc bằng bộ lọc 250-mL Filter System (CORNING, #431096).

Kháng thể người dạng khảm 151D thu được bằng tổ hợp của vector biểu hiện chuỗi nặng người dạng khảm 151D với vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm 151D được gọi là "c151D," trong khi kháng thể người dạng khảm 198D thu được bằng tổ hợp của vector biểu hiện chuỗi nặng người dạng khảm 198D với vector biểu hiện chuỗi nhẹ người dạng khảm 198D được gọi là "c198D".

6)-4-2 Tinh chế kháng thể dạng khảm

Dịch nổi nuôi cấy thu được trong Ví dụ 6)-4-1 được tinh chế bằng quy trình sắc ký ái lực rProtein A một giai đoạn. Dịch nổi nuôi cấy được nạp lên cột (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) đã nạp sẵn MabSelectSuRe cân bằng bằng PBS, và tiếp theo cột này được rửa bằng PBS với lượng hai hoặc nhiều lần thể tích cột. Tiếp theo, giải hấp được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch 2 M arginin hydroclorua (pH 4,0), để phân đoạn chứa kháng thể được thu. Phân đoạn này được cho qua Thiết bị siêu lọc ly tâm VIVASPIN20 (molecular weight cutoff: UF30K, Sartorius), để đệm được thay bằng PBS và kháng thể được cô, theo đó điều chỉnh nồng độ kháng thể đến 1 mg/mL hoặc lớn hơn. Cuối cùng, kháng thể được lọc qua Minisart-Plus (Sartorius) để thu mẫu đã tinh chế.

6)-5 Đánh giá hoạt tính liên kết của kháng thể người dạng khảm với GARP người

Hằng số phân ly giữa c151D hoặc c198D sản xuất được trong Ví dụ 6)-4 và GARP người được đánh giá bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience), theo phương pháp này, phương pháp này bao gồm bước bẫy kháng thể

làm phối tử với Protein A cố định và tiếp theo phân tích hằng số phân ly bằng cách sử dụng kháng nguyên (recombinant human GARP: R&D Systems) làm chất phân tích. HBS-EP+ (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) được sử dụng làm đệm chạy, và Protein A Sensor Chip (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) được sử dụng làm chip cảm biến.

Kháng thể người dạng khảm (1 $\mu\text{g/mL}$) được thêm vào chip ở tốc độ 10 $\mu\text{L/phút}$ trong 20 giây, và dung dịch pha loãng theo bậc (8 đến 128 nM) của kháng nguyên tiếp theo được thêm vào ở tốc độ chảy 30 $\mu\text{L/phút}$ trong 120 giây. Tiếp theo, sự phân ly được theo dõi trong 480 giây. Về dung dịch tái sinh, Glyxin 1.5 (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) được thêm vào ở tốc độ chảy 20 $\mu\text{L/phút}$ trong 30 giây.

Mô hình so khớp 1 : 1 được sử dụng trong phân tích dữ liệu, và hằng số tốc độ tổ hợp k_a , hằng số tốc độ phân ly k_d , và hằng số phân ly (KD; $\text{KD} = k_d/k_a$) được tính.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1 Hằng số phân ly giữa c151D hoặc c198D và GARP người

[Bảng 1]

	Tên	KD (nM)
1	c151D	0,47
2	c198D	0,17

Ví dụ 7 Sản xuất kháng thể được nhân hóa

7)-1 Lập mô hình phân tử vùng biến đổi của kháng thể c151D

Việc lập mô hình phân tử vùng biến đổi của kháng thể c151D được thực hiện theo phương pháp mà nói chung được biết là mô hình tương đồng (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)).

Trình tự bậc một của vùng biến đổi của globulin miễn dịch người đã đăng ký trong Protein Data Bank (Nuc. Acid Res.28, 235-242 (2000)) (cấu trúc ba chiều suy ra từ cấu trúc tinh thể tia X là có thể sử dụng) được so sánh với vùng biến đổi của kháng thể c151D.

Cấu trúc ba chiều của vùng biến đổi được sản xuất bằng cách kết hợp, với nhau, các tọa độ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể c151D và mô hình có độ tương đồng trình tự cao với các giao diện, để thu được "mô hình khung".

Sau đó, cấu hình đại diện của mỗi CDR được hợp nhất vào mô hình khung.

Cuối cùng, để loại bỏ tiếp xúc nguyên tử gây bất lợi về năng lượng, phép tính giảm thiểu năng lượng được thực hiện. Các quy trình được mô tả ở trên được thực hiện bằng cách sử dụng Discovery Studio (Dassault Systemes).

7)-2 Thiết kế Trình tự axit amin của kháng thể 151D được nhân hóa

Kháng thể 151D được nhân hóa được cấu trúc theo phương pháp nói chung được biết là ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể nhận được chọn trên cơ sở tương đồng axit amin trong vùng khung.

Trình tự của vùng khung của kháng thể c151D được so sánh với vùng khung của trình tự liên ứng nhóm phụ được xác định bởi KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Kết quả là, trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi γ người 3 và nhóm phụ chuỗi κ người 1 và 4 có độ tương đồng trình tự cao, và trên cơ sở này, chúng được chọn làm thể nhận.

Liên quan đến trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi γ người 3 và trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi κ người 1 và nhóm phụ chuỗi κ người 4, các gốc axit amin trong vùng khung được sắp hàng với các gốc axit amin của kháng thể c151D, để các vị trí, trong đó axit amin khác được sử dụng, được nhận dạng. Các vị trí của các gốc này được phân tích bằng cách sử dụng mô hình ba chiều của kháng thể c151D được cấu trúc trong phần 7)-1 ở trên, và các gốc nhận cần được ghép với thể nhận được chọn trên cơ sở các tiêu chuẩn được đưa ra bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Vài gốc cho được chọn theo cách này được đưa vào kháng thể nhận, để cấu trúc trình tự của h151D được nhân hóa như theo cách được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

7)-3 Thiết kế chuỗi nặng 151D được nhân hóa h151D-H

7)-3-1 Chuỗi nặng kiểu h151D-H1

Chuỗi nặng 151D được nhân hóa được thiết kế bằng cách thay thế gốc arginin tại vị trí axit amin 35 bằng gốc glyxin, gốc lysin tại vị trí axit amin 37 bằng gốc leuxin, gốc lysin tại vị trí axit amin 38 bằng gốc arginin, gốc serin tại vị trí axit amin 42 bằng gốc alanin, gốc threonin tại vị trí axit amin 61 bằng gốc glyxin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 62 bằng gốc lysin, gốc alanin tại vị trí axit amin 68 bằng gốc serin, gốc arginin tại vị trí axit amin 80 bằng gốc alanin, gốc alanin tại vị trí axit amin 94 bằng gốc serin, gốc serin tại vị trí axit amin 96 bằng gốc asparagin, gốc axit aspartic tại vị trí axit amin 103 bằng gốc asparagin, gốc serin tại vị trí axit amin 107 bằng gốc alanin, gốc threonin tại vị trí axit amin 112 bằng gốc valin, gốc valin tại vị trí axit amin 130 bằng gốc threonin, và gốc methionin tại vị trí axit amin 131 bằng gốc leuxin trong chuỗi nặng c151D nêu trong SEQ ID NO: 25 trong danh mục trình tự, được gọi là "chuỗi nặng kiểu h151D-H1".

Trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 32) mã hóa chuỗi nặng kiểu h151D-H1, chuỗi nặng trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398, vùng biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408, và vùng ổn định được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 409 đến 1398. Vùng biến đổi nêu trên có trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 133 đến 162 mã hóa CDRH1, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 205 đến 234 mã hóa CDRH2, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 352 đến 375 mã hóa CDRH3, trong SEQ ID NO: 32 trong danh mục trình tự.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 33) của chuỗi nặng kiểu h151D-H1, chuỗi nặng trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466, vùng biến đổi là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136, và vùng ổn định là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 137 đến 466. Vùng biến đổi nêu trên có CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 45 đến 54 trong SEQ ID NO: 33 trong danh mục trình tự, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại

các vị trí axit amin 69 đến 78 trong đó, và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 118 đến 125 trong đó.

Hơn nữa, các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32 và 33 cũng lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.31 và Fig.21.

7)-3-2 Chuỗi nặng kiểu h151D_H4

Chuỗi nặng 151D được nhân hóa được thiết kế bằng cách thay thế gốc arginin tại vị trí axit amin 35 bằng gốc glyxin, gốc lysin tại vị trí axit amin 37 bằng gốc leuxin, gốc lysin tại vị trí axit amin 38 bằng gốc arginin, gốc serin tại vị trí axit amin 42 bằng gốc alanin, gốc threonin tại vị trí axit amin 61 bằng gốc glyxin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 62 bằng gốc lysin, gốc alanin tại vị trí axit amin 94 bằng gốc serin, gốc axit aspartic tại vị trí axit amin 103 bằng gốc asparagin, gốc serin tại vị trí axit amin 107 bằng gốc alanin, gốc threonin tại vị trí axit amin 112 bằng gốc valin, gốc valin tại vị trí axit amin 130 bằng gốc threonin, và gốc methionin tại vị trí axit amin 131 bằng gốc leuxin trong chuỗi nặng c151D nêu trong SEQ ID NO: 25 trong danh mục trình tự, được gọi là "chuỗi nặng kiểu h151D_H4".

Trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 34) mã hóa chuỗi nặng kiểu h151D-H4, chuỗi nặng trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398, vùng biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408, và vùng ổn định được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 409 đến 1398. Vùng biến đổi nêu trên có trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 133 đến 162 mã hóa CDRH1, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 205 đến 234 mã hóa CDRH2, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 352 đến 375 mã hóa CDRH3, trong SEQ ID NO: 34 trong danh mục trình tự.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 35) của chuỗi nặng kiểu h151D-H4, chuỗi nặng trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466, vùng biến đổi là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136, và vùng ổn định là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 137 đến 466. Vùng biến

đổi nêu trên có CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 45 đến 54 trong SEQ ID NO: 35 trong danh mục trình tự, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 69 đến 78 trong đó, và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 118 đến 125 trong đó.

Hơn nữa, các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34 và 35 cũng lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.33 và Fig.23.

7)-4 Thiết kế chuỗi nhẹ 151D được nhân hóa h151D_L

7)-4-1 Chuỗi nhẹ kiểu h151D-L1

Chuỗi nhẹ 151D được nhân hóa được thiết kế bằng cách thay thế gốc threonin tại vị trí axit amin 29 bằng gốc axit aspartic, gốc methionin tại vị trí axit amin 31 bằng gốc leuxin, gốc phenylalanin tại vị trí axit amin 32 bằng gốc alanin, gốc isoleuxin tại vị trí axit amin 33 bằng gốc valin, gốc valin tại vị trí axit amin 35 bằng gốc leuxin, gốc axit aspartic tại vị trí axit amin 37 bằng gốc axit glutamic, gốc valin tại vị trí axit amin 39 bằng gốc alanin, gốc methionin tại vị trí axit amin 41 bằng gốc isoleuxin, gốc threonin tại vị trí axit amin 60 bằng gốc prolin, gốc threonin tại vị trí axit amin 83 bằng gốc serin, gốc asparagin tại vị trí axit amin 97 bằng gốc serin, gốc methionin tại vị trí axit amin 98 bằng gốc leuxin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 103 bằng gốc valin, gốc threonin tại vị trí axit amin 120 bằng gốc glutamin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 124 bằng gốc valin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 126 bằng gốc isoleuxin, gốc asparagin tại vị trí axit amin 127 bằng gốc lysin, và gốc alanin tại vị trí axit amin 129 bằng gốc threonin trong chuỗi nhẹ c151D nêu trong SEQ ID NO: 27 trong danh mục trình tự, được gọi là "chuỗi nhẹ kiểu h151D_L1".

Trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 36) mã hóa chuỗi nhẹ kiểu h151D-L1, chuỗi nhẹ trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702, vùng biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387, và vùng ổn định được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702. Vùng biến đổi nêu trên có trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 mã hóa CDRL1, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 208 đến 228 mã hóa CDRL2, và trình tự nucleotit

gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 325 đến 351 mã hóa CDRL3, trong SEQ ID NO: 36 trong danh mục trình tự.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 37) của chuỗi nhẹ kiểu h151D_L1, chuỗi nhẹ trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234, vùng biến đổi là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129, và vùng ổn định là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 130 đến 234. Vùng biến đổi nêu trên có CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 44 đến 54 trong SEQ ID NO: 37 trong danh mục trình tự, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 70 đến 76 trong đó, và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 109 đến 117 trong đó.

Hơn nữa, các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 36 và 37 cũng lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.32 và Fig.22.

7)-4-2 Chuỗi nhẹ kiểu h151D-L4:

Chuỗi nhẹ 151D được nhân hóa được thiết kế bằng cách thay thế gốc threonin tại vị trí axit amin 29 bằng gốc serin, gốc methionin tại vị trí axit amin 31 bằng gốc leuxin, gốc phenylalanin tại vị trí axit amin 32 bằng gốc serin, gốc isoleuxin tại vị trí axit amin 33 bằng gốc alanin, gốc methionin tại vị trí axit amin 41 bằng gốc isoleuxin, gốc threonin tại vị trí axit amin 60 bằng gốc prolin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 62 bằng gốc lysin, gốc threonin tại vị trí axit amin 83 bằng gốc serin, gốc asparagin tại vị trí axit amin 97 bằng gốc serin, gốc methionin tại vị trí axit amin 98 bằng gốc leuxin, gốc alanin tại vị trí axit amin 100 bằng gốc prolin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 103 bằng gốc phenylalanin, gốc valin tại vị trí axit amin 105 bằng gốc threonin, gốc threonin tại vị trí axit amin 120 bằng gốc glutamin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 124 bằng gốc valin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 126 bằng gốc isoleuxin, gốc asparagin tại vị trí axit amin 127 bằng gốc lysin, và gốc alanin tại vị trí axit amin 129 bằng gốc threonin trong chuỗi nhẹ c151D nêu trong SEQ ID NO: 27 trong danh mục trình tự, được gọi là "chuỗi nhẹ kiểu h151D-L4".

Trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 38) mã hóa chuỗi nhẹ kiểu h151D-L4, chuỗi nhẹ trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, được mã hóa bởi

trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702, vùng biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387, và vùng ổn định được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702. Vùng biến đổi nêu trên có trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 mã hóa CDRL1, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 208 đến 228 mã hóa CDRL2, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 325 đến 351 mã hóa CDRL3, trong SEQ ID NO: 38 trong danh mục trình tự.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 39) của chuỗi nhẹ kiểu h151D_L4, chuỗi nhẹ trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234, vùng biến đổi là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129, và vùng ổn định là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 130 đến 234. Vùng biến đổi nêu trên có CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 44 đến 54 trong SEQ ID NO: 39 trong danh mục trình tự, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 70 đến 76 trong đó, và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 109 đến 117 trong đó.

Hơn nữa, các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 38 và 39 cũng lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.34 và Fig.24.

7)-5 Lập mô hình phân tử vùng biến đổi của c198D

Việc lập mô hình phân tử vùng biến đổi của kháng thể c198D được thực hiện theo phương pháp nói chung được biết là lập mô hình tương đồng (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Trình tự bậc một của vùng biến đổi của globulin miễn dịch người đăng ký tại Protein Data Bank (Nuc. Acid Res.28, 235-242 (2000)) (cấu trúc ba chiều suy ra từ cấu trúc tinh thể tia X là có thể sử dụng) được so sánh với vùng biến đổi của kháng thể c198D.

Cấu trúc ba chiều của vùng biến đổi được sản xuất bằng cách kết hợp, với nhau, các tọa độ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể c198D và mô hình có độ tương đồng trình tự cao với các giao diện của chúng, để thu được "mô hình khung".

Sau đó, cấu hình đại diện của mỗi CDR được hợp nhất vào mô hình khung.

Cuối cùng, để loại bỏ tiếp xúc nguyên tử gây bất lợi về năng lượng, phép tính giảm thiểu năng lượng được thực hiện. Các quy trình được mô tả ở trên được thực hiện bằng cách sử dụng Discovery Studio (Dassault Systemes).

7)-6 Thiết kế Trình tự axit amin của 198D được nhân hóa

Kháng thể 198D được nhân hóa được cấu trúc theo phương pháp nói chung được biết là ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể nhận được chọn trên cơ sở tương đồng axit amin trong vùng khung.

Trình tự của vùng khung của kháng thể c198D được so sánh với vùng khung của trình tự liên ứng nhóm phụ được xác định bởi KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Kết quả là, trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi γ người 2 và nhóm phụ chuỗi κ người 1 có độ tương đồng trình tự cao, và trên cơ sở này, chúng được chọn làm thể nhận. Ngoài ra, vài gốc trong trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi γ người 3 được đưa vào thể nhận của chuỗi nặng.

Liên quan đến trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi γ người 2 bao gồm phần trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi γ người 3 và trình tự liên ứng của nhóm phụ chuỗi κ người 1, các gốc axit amin trong vùng khung được sắp hàng với các gốc axit amin của kháng thể c198D, để các vị trí, trong đó axit amin khác nhau được sử dụng, được nhận dạng. Vị trí các gốc này được phân tích bằng cách sử dụng mô hình ba chiều của kháng thể c198D được cấu trúc trong 7)-5 ở trên, và các gốc cho cần ghép với thể nhận được chọn trên cơ sở các tiêu chuẩn được đưa ra bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Vài gốc cho được chọn theo cách này được đưa vào kháng thể nhận, để cấu trúc trình tự của h198D được nhân hóa như theo cách được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

7)-7 Thiết kế chuỗi nặng 198D được nhân hóa h198D-H

7)-7-1 Chuỗi nặng kiểu h198D-H3

Chuỗi nặng 198D được nhân hóa được thiết kế bằng cách thay thế gốc glutamin tại vị trí axit amin 20 bằng gốc axit glutamic, gốc arginin tại vị trí axit amin 24 bằng gốc valin, gốc prolin tại vị trí axit amin 28 bằng gốc glyxin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 32 bằng gốc lysin, gốc axit glutamic tại vị trí axit amin 61 bằng gốc glyxin, gốc

serin tại vị trí axit amin 80 bằng gốc prolin, gốc alanin tại vị trí axit amin 81 bằng gốc serin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 86 bằng gốc valin, gốc serin tại vị trí axit amin 87 bằng gốc threonin, gốc serin tại vị trí axit amin 95 bằng gốc asparagin, gốc phenylalanin tại vị trí axit amin 98 bằng gốc serin, gốc methionin tại vị trí axit amin 101 bằng gốc leuxin, gốc threonin tại vị trí axit amin 103 bằng gốc serin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 104 bằng gốc valin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 105 bằng gốc threonin, gốc threonin tại vị trí axit amin 106 bằng gốc alanin, gốc axit glutamic tại vị trí axit amin 107 bằng gốc alanin, gốc methionin tại vị trí axit amin 111 bằng gốc valin, gốc phenylalanin tại vị trí axit amin 113 bằng gốc tyrosin, gốc alanin tại vị trí axit amin 133 bằng gốc threonin, và gốc serin tại vị trí axit amin 134 bằng gốc leuxin trong chuỗi nặng c198D nêu trong SEQ ID NO: 29 trong danh mục trình tự, được gọi là "chuỗi nặng kiểu h198D_H3".

Trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 40) mã hóa chuỗi nặng kiểu h198D-H3, chuỗi nặng trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1407, vùng biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 417, và vùng ổn định được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 418 đến 1407. Vùng biến đổi nêu trên có trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 mã hóa CDRH1, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 205 đến 231 mã hóa CDRH2, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 349 đến 384 mã hóa CDRH3, trong SEQ ID NO: 40 trong danh mục trình tự.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 41) của chuỗi nặng kiểu h198D-H3, chuỗi nặng trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 469, vùng biến đổi là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 139, và vùng ổn định là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 140 đến 469.

Hơn nữa, các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40 và 41 cũng lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.35 và Fig.25.

7)-8 Thiết kế chuỗi nhẹ 198D được nhân hóa h198D-L

7)-8-1 Chuỗi nhẹ kiểu h198D-L4

Chuỗi nhẹ 198D được nhân hóa được thiết kế bằng cách thay thế gốc alanin tại vị trí axit amin 29 bằng gốc serin, gốc glyxin tại vị trí axit amin 33 bằng gốc alanin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 35 bằng gốc valin, gốc axit glutamic tại vị trí axit amin 37 bằng gốc axit aspartic, gốc threonin tại vị trí axit amin 38 bằng gốc arginin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 42 bằng gốc threonin, gốc glutamin tại vị trí axit amin 65 bằng gốc lysin, gốc glyxin tại vị trí axit amin 85 bằng gốc serin, gốc serin tại vị trí axit amin 92 bằng gốc threonin, gốc lysin tại vị trí axit amin 94 bằng gốc threonin, gốc methionin tại vị trí axit amin 98 bằng gốc leuxin, gốc threonin tại vị trí axit amin 100 bằng gốc prolin, gốc axit glutamic tại vị trí axit amin 103 bằng gốc phenylalanin, gốc glyxin tại vị trí axit amin 104 bằng gốc alanin, gốc valin tại vị trí axit amin 105 bằng gốc threonin, gốc serin tại vị trí axit amin 120 bằng gốc glutamin, gốc leuxin tại vị trí axit amin 124 bằng gốc valin, và gốc alanin tại vị trí axit amin 129 bằng gốc threonin trong chuỗi nhẹ c198D nêu trong SEQ ID NO: 31 trong danh mục trình tự, được gọi là "chuỗi nhẹ kiểu h198D-L4".

Trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 42) mã hóa chuỗi nhẹ kiểu h198D-L4, chuỗi nhẹ trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702, vùng biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387, và vùng ổn định được mã hóa bởi trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 388 đến 702. Vùng biến đổi nêu trên có trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 mã hóa CDRL1, trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 208 đến 228 mã hóa CDRL2, và trình tự nucleotit gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 325 đến 351 mã hóa CDRL3, trong SEQ ID NO: 42 trong danh mục trình tự.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 43) của chuỗi nhẹ kiểu h198D_L4, chuỗi nhẹ trưởng thành, mà từ đó trình tự tín hiệu đã được loại bỏ, là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234, vùng biến đổi là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129, và vùng ổn định là trình tự axit amin gồm có các axit amin tại các vị trí axit amin 130 đến 234.

Hơn nữa, các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 42 và 43 cũng lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig.36 và Fig.26.

7)-9 Cấu trúc vector biểu hiện đối với kháng thể được nhân hóa

7)-9-1 Cấu trúc vector biểu hiện đối với kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1

Đoạn ADN bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng kiểu h151D-H1 gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 của trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu h151D-H1 nêu trong SEQ ID NO: 32 trong danh mục trình tự được tổng hợp (GENEART, artificial gene synthesis service). Bằng cách sử dụng đoạn ADN tổng hợp được, theo quy trình Potelligent(R) CHOK1SV Technology của BioWa và Lonza, vector biểu hiện đối với chuỗi nặng kiểu h151D-H1 được cấu trúc. Vector biểu hiện được cấu trúc được gọi là "GSV-h151D-H1."

Tiếp theo, đoạn ADN bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ kiểu h151D-L1 gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 của trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu h151D-L1 nêu trong SEQ ID NO: 36 trong danh mục trình tự được tổng hợp (GENEART, artificial gene synthesis service).

Bằng cách sử dụng đoạn ADN tổng hợp được, theo quy trình Potelligent(R) CHOK1SV Technology của BioWa và Lonza, vector biểu hiện đối với chuỗi nhẹ kiểu h151D-L1 được cấu trúc. Vector biểu hiện được cấu trúc được gọi là "GSV-h151D-L1."

Tiếp theo, vector biểu hiện MACA-1511a được cấu trúc từ các vector biểu hiện được cấu trúc "GSV-h151D-H1" và "GSV-h151D-L1" theo quy trình Potelligent(R) CHOK1SV Technology của BioWa và Lonza. Vector biểu hiện thu được được gọi là "DGV-h151D-H1L1-GS."

7)-9-2 Cấu trúc vector biểu hiện đối với kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4

Như trong trường hợp của Ví dụ 7)-9-1, đoạn ADN bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng kiểu h151D-H4 gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 của trình tự nucleotit chuỗi nặng kiểu h151D-H4 nêu trong SEQ ID NO: 34 trong danh mục trình tự, và đoạn ADN bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ kiểu h151D-L4 gồm có

các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 của trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu h151D-L4 nêu trong SEQ ID NO: 38 trong danh mục trình tự, được tổng hợp (GENEART, artificial gene synthesis service).

Bằng cách sử dụng đoạn ADN tổng hợp được, theo quy trình Potelligent(R) CHOK1SV Technology của BioWa và Lonza, vector biểu hiện MACA-1514a được cấu trúc. Vector biểu hiện này được gọi là "DGV-h151D-H4L4-GS."

7)-9-3 Cấu trúc vector biểu hiện đối với kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4

Như trong trường hợp của Ví dụ 7)-9-1, đoạn ADN bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng kiểu h198D-H3 gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1407 của trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu h198D-H3 nêu trong SEQ ID NO: 40 trong danh mục trình tự, và đoạn ADN bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ kiểu h198D-L4 gồm có các nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 của trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu h198D-L4 nêu trong SEQ ID NO: 42 trong danh mục trình tự, được tổng hợp (GENEART, artificial gene synthesis service).

Bằng cách sử dụng đoạn ADN tổng hợp được, theo quy trình Potelligent(R) CHOK1SV Technology của BioWa và Lonza, vector biểu hiện MACA-1983a được cấu trúc. Vector biểu hiện thu được được gọi là "DGV-h198D-H3L4-GS."

7)-10 Điều chế kháng thể kháng GARP người được nhân hóa

7)-10-1 Sản xuất tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa

7)-10-1-1 Sản xuất tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1

Tế bào Potelligent CHOK1SV (BioWa và Lonza) được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1, DGV-h151D-H1L1-GS, vector này đã được cấu trúc trong Ví dụ 7)-9-1 theo quy trình Potelligent(R) CHOK1SV Technology của BioWa và Lonza, để cấu trúc dòng tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1. Dòng tế bào sản xuất thu được được gọi là "MAC1-1."

7)-10-1-2 Sản xuất tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4

Như trong trường hợp của Ví dụ 7)-10-1-1, tế bào Potelligent CHOK1SV (BioWa và Lonza) được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4, DGV-h151D-H4L4-GS, vector này đã được cấu trúc trong Ví dụ 7)-9-2, để cấu trúc dòng tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4. Dòng tế bào sản xuất thu được được gọi là "MAC2-1."

7)-10-1-3 Sản xuất tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4

Như trong trường hợp của Ví dụ 7)-10-1-1, tế bào Potelligent CHOK1SV (BioWa và Lonza) được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4, DGV-h198D-H3L4-GS, vector này đã được cấu trúc trong Ví dụ 7)-9-3, để cấu trúc dòng tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4. Dòng tế bào sản xuất thu được được gọi là "MAC3-1."

7)-10-2 Nuôi cấy tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa

7)-10-2-1 Nuôi cấy tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1

Dòng tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1 "MAC1-1" sản xuất được trong Ví dụ 7)-10-1-1 được nuôi cấy bằng cách sử dụng thiết bị nuôi cấy Wave reactor (GE Healthcare Japan). Dòng tế bào sản xuất "MAC1-1" được làm tan băng trong môi trường Dsp04B (JX Energy), và tiếp theo nuôi cấy trong môi trường Dsp04B (JX Energy) ở 120 vòng/phút trong thiết bị ủ (37°C, 5% CO₂). Dung dịch nuôi cấy thu được được pha loãng bằng môi trường C36 (JX Energy), và tiếp theo nuôi cấy mở rộng ở 120 vòng/phút trong thiết bị ủ (37°C, 5% CO₂).

Dung dịch nuôi cấy thu được được pha loãng bằng môi trường C36 ở 30×10^4 tế bào/mL, và tiếp theo chuyển vào WAVE CELLBAG (GE Healthcare Bioscience), tiếp theo thực hiện nuôi cấy ở 37°C trong 5% CO₂, ở tốc độ cấp khí 0,3 L/phút, ở tốc độ quay 18-24 vòng/phút, ở góc 6-8°, trong 13 ngày.

Từ ngày thứ 3 sau cấy, môi trường FM4Ae2 (tự điều chế) được thêm vào môi trường nuôi cấy với lượng 6% thể tích nuôi cấy ban đầu/ngày. Dung dịch nuôi cấy thu được về cơ bản được lọc qua bộ lọc sâu Millistak MC0HC054H1 (Merck Millipore), và tiếp theo lọc qua bộ lọc 0,22- μ m (Sartorius) gắn với Flexboy Bags. Chất lọc này được gọi là "dịch nổi nuôi cấy MACA-1511".

7)-10-2-2 Nuôi cấy tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4

Theo cách tương tự được áp dụng trong Ví dụ 7)-10-2-1, dòng tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4 "MAC2-1" sản xuất được trong Ví dụ 7)-10-1-2 được nuôi cấy và mở rộng, và sau đó, tế bào được nuôi cấy theo mẻ bằng cách sử dụng thiết bị nuôi cấy Wave reactor (GE Healthcare Japan). Dung dịch nuôi cấy thu được được pha loãng bằng môi trường C36 ở 30×10^4 tế bào/mL, và tiếp theo chuyển vào WAVE CELLBAG (GE Healthcare Bioscience), tiếp theo thực hiện nuôi cấy trong 13 ngày. Dung dịch nuôi cấy thu được được lọc, và chất lọc thu được được gọi là "dịch nổi nuôi cấy MACA-1514".

7)-10-2-3 Nuôi cấy tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4

Theo cách tương tự được áp dụng trong Ví dụ 7)-10-2-1, dòng tế bào sản xuất kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4 "MAC3-1" sản xuất được trong Ví dụ 7)-10-1-3 được nuôi cấy và mở rộng, và sau đó, tế bào được nuôi cấy theo mẻ bằng cách sử dụng thiết bị nuôi cấy Wave reactor (GE Healthcare Japan). Dung dịch nuôi cấy thu được được pha loãng bằng môi trường C36 ở 30×10^4 tế bào/mL, và tiếp theo chuyển vào WAVE CELLBAG (GE Healthcare Bioscience), tiếp theo thực hiện nuôi cấy trong 13 ngày. Dung dịch nuôi cấy thu được được lọc, và chất lọc thu được được gọi là "dịch nổi nuôi cấy MACA-1983".

7)-10-3 Tinh chế kháng thể kháng GARP người được nhân hóa

7)-10-3-1 Tinh chế kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1

"Dịch nổi nuôi cấy MACA-1511" thu được trong Ví dụ 7)-10-2-1 được tinh chế bằng quy trình ba bước, tức là, bằng sắc ký ái lực rProtein A, sắc ký trao đổi anion, và sắc ký trao đổi cation.

Trước tiên, dịch nổi nuôi cấy được nạp lên nhựa sắc ký ái lực rProtein A đã được cân bằng bằng PBS. Sau khi toàn bộ dung dịch nuôi cấy đã đi vào cột, cột được rửa bằng PBS, đệm chứa arginin, và PBS. Tiếp theo, chất còn lại trong được giải hấp bằng đệm axetat, và đỉnh hấp thụ ở 280 nm tiếp theo được thu. Dung dịch đã thu được trung hòa bằng đệm Tris, và tiếp theo về cơ bản lọc qua bộ lọc sợi thủy tinh AP20 (Merck Millipore). Dung dịch được lọc qua Stericup-GV (Merck Millipore) là bộ lọc 0,22- μ m, và dịch lọc thu được được xác định là hỗn hợp tinh chế bằng rProtein A.

Tiếp theo, hỗn hợp tinh chế bằng rProtein A được nạp lên nhựa sắc ký trao đổi anion đã được cân bằng bằng PBS. Sau khi toàn bộ dịch nạp đã đi vào cột, PBS được cấp. Phân đoạn qua dòng và đỉnh hấp thụ ở 280 nm tại lúc cấp PBS được thu. Độ pH của dung dịch thu được được điều chỉnh bằng axit axetic, và tiếp theo dung dịch này về cơ bản được lọc qua bộ lọc sợi thủy tinh AP20 (Merck Millipore). Dung dịch được lọc qua Stericup-GV (Merck Millipore) là bộ lọc 0,22- μ m, và chất lọc thu được được xác định là hỗn hợp tinh chế AEX.

Tiếp theo, hỗn hợp tinh chế AEX được nạp lên nhựa sắc ký trao đổi cation đã được cân bằng đệm axetat. Sau khi toàn bộ dịch nạp đã đi vào cột, cột được rửa bằng đệm axetat. Sau đó, giải hấp được thực hiện bằng cách sử dụng đệm axetat chứa nồng độ cao NaCl, và đỉnh hấp thụ ở 280 nm được thu. Dung dịch này về cơ bản được lọc qua bộ lọc sợi thủy tinh AP20 (Merck Millipore), và tiếp theo lọc qua Stericup-GV (Merck Millipore) là bộ lọc 0,22- μ m. Chất lọc thu được được xác định là hỗn hợp tinh chế CEX.

Hỗn hợp tinh chế CEX được cô đến nồng độ kháng thể 25 mg/mL bằng Pellicon 3 Cassette 30 kDa (Merck Millipore), và đệm tiếp theo được thay bằng đệm histidin (25mM Histidin, 5% Sorbitol, pH 6,0). Cuối cùng, dung dịch này về cơ bản được lọc qua bộ lọc sợi thủy tinh AP20 (Merck Millipore), và tiếp theo lọc qua Stericup-GV (Merck Millipore) là bộ lọc 0,22- μ m, để thu mẫu đã tinh chế. Mẫu đã tinh chế này được gọi là "h151D-H1L1."

7)-10-3-2 Tinh chế kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H4L4

Theo cách tương tự được áp dụng trong Ví dụ 7)-10-3-1, "dịch nổi nuôi cấy MACA-1514" thu được trong Ví dụ 7)-10-2-2 được tinh chế bằng quy trình ba bước,

tức là, bằng sắc ký ái lực rProtein A, sắc ký trao đổi anion, và sắc ký trao đổi cation.

Mẫu đã tinh chế này được gọi là "h151D-H4L4."

7)-10-3-3 Tinh chế kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h198D-H3L4

Theo cách tương tự được áp dụng trong Ví dụ 7)-10-3-1, "dịch nổi nuôi cấy MACA-1983" thu được trong Ví dụ 7)-10-2-3 được tinh chế bằng quy trình ba bước, tức là, bằng sắc ký ái lực rProtein A, sắc ký trao đổi anion, và sắc ký trao đổi cation. Mẫu đã tinh chế này được gọi là "h198D-H3L4."

7)-11 Đánh giá hoạt tính liên kết của kháng thể kháng GARP người được nhân hóa đối với GARP người

Hằng số phân ly giữa mỗi kháng thể kháng GARP người được nhân hóa h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 sản xuất được trong Ví dụ 7)-10 và GARP được đánh giá bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience), theo phương pháp bẫy, phương pháp này bao gồm bẫy kháng thể dưới dạng phối tử bằng Protein A cố định và tiếp theo phân tích hằng số phân ly bằng cách sử dụng kháng nguyên làm chất phân tích. HBS-EP+ (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) được sử dụng làm đệm chạy, và Protein A Sensor Chip (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) được sử dụng làm chip cảm biến.

Kháng thể người dạng khảm (1 $\mu\text{g/mL}$) được thêm vào chip ở tốc độ 10 $\mu\text{L/phút}$ trong 20 giây, và dung dịch pha loãng theo bậc (8 đến 128 nM) của kháng nguyên được thêm vào ở tốc độ chảy 30 $\mu\text{L/phút}$ trong 120 giây. Tiếp theo, sự phân ly được theo dõi trong 480 giây. Về dung dịch tái sinh, Glyxin 1.5 (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience) được thêm vào ở tốc độ chảy 20 $\mu\text{L/phút}$ trong 30 giây.

Mô hình so khớp 1 : 1 được sử dụng trong phân tích dữ liệu, và hằng số tốc độ tổ hợp k_a , hằng số tốc độ phân ly k_d , và hằng số phân ly (KD; $\text{KD} = k_d/k_a$) được tính.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2 Hằng số phân ly của kháng thể kháng GARP người được nhân hóa

[Bảng 2]

	Tên	KD (nM)
1	h151D-H1L1	1,8
2	h151D-H4L4	1,2

3	h198D-H3L4	0,088
---	------------	-------

Ví dụ 8: liên kết với tế bào biểu hiện gen kháng nguyên

8)-1 Liên kết với GARP

Theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2, huyền phù tế bào HEK-293T, mà trong đó vector biểu hiện GARP người hoặc vector đối chứng đã được chuyển nhiễm vào, được điều chế. h151D-H1L1, h151D-H4L4, h198D-H3L4, và IgG người đối chứng (IgG người: Eureka Therapeutics) được thêm vào huyền phù tế bào, và tế bào được ủ ở 4°C trong 15 phút.

Tế bào được rửa hai lần bằng đệm FACS (PBS (Invitrogen) có bổ sung 3% FBS), và sau đó, kháng thể kháng IgG đã đánh dấu R-Phycoerythrin (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) và Horizon FVS450 (Becton Dickinson) được thêm vào và được tạo huyền phù. Tế bào được ủ tiếp ở 4°C trong 15 phút. Phân tích bào kế dạng dòng được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2, và sơ đồ cường độ huỳnh quang PE được tạo ra (Fig.37).

Sơ đồ cường độ huỳnh quang đối với h151D-H1L1, h151D-H4L4, và h198D-H3L4 trong tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm bằng vector đối chứng là giống với sơ đồ cường độ huỳnh quang đối với IgG đối chứng (trên hình vẽ, tế bào được gọi là "HEK-293T được chuyển nhiễm vector Mock").

Mặt khác, xác nhận được rằng sơ đồ cường độ huỳnh quang đối với h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 dịch chuyển về phía cường độ huỳnh quang mạnh trong tế bào HEK-293T biểu hiện GARP (tế bào này được gọi là "HEK-293T được chuyển nhiễm hGARP" trên hình vẽ) so với sơ đồ cường độ huỳnh quang đối với IgG người đối chứng.

Từ các kết quả nêu trên, phát hiện ra rằng h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 liên kết đặc hiệu với GARP.

8)-2 Liên kết với GARP-TGF β 1

8)-2-1 Cấu trúc vector biểu hiện thể đột biến GARP người

Bằng cách sử dụng vector biểu hiện GARP người (Origene) làm khuôn, và cũng bằng cách sử dụng môi F (cacggcaacctgctggagcggctgctgggggagg) (SEQ ID NO: 44),

mồi R (caggtgttcccagacaggtccag) (SEQ ID NO: 45), và KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo), YSG tại các vị trí axit amin 137-139 trong trình tự axit amin GARP người (SEQ ID NO: 1) được chuyển hóa thành HGN, để cấu trúc vector biểu hiện thể đột biến GARP người. Tiếp theo, trình tự nucleotit của vector này được xác nhận.

8)-2-2 Biểu hiện đồng thời GARP-TGF β 1

Bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen), tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện TGF β 1 người (Sino Biological), cũng như vector biểu hiện GARP người hoặc vector biểu hiện thể đột biến GARP người.

Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS qua đêm trong 5% CO₂ ở 37°C, và tế bào này tiếp theo được thu hoạch từ đĩa bằng cách xử lý chúng bằng TrypLE Express (Invitrogen). Tế bào thu hoạch được được rửa hai lần bằng đệm FACS và được tạo huyền phù lại trong cùng dung dịch.

Các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 theo sáng chế, các kháng thể đã biết (các kháng thể IgG1 người kháng GARP MHG8 và LHG10 mà chúng được sản xuất trên cơ sở thông tin trình tự được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1), và IgG người đối chứng (Eureka Therapeutics) được thêm vào huyền phù tế bào, và tế bào được ủ ở 4°C trong 15 phút.

Tế bào được rửa hai lần bằng đệm FACS, và kháng thể kháng IgG đã đánh dấu PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories) và Horizon FVS450 (Becton Dickinson) được thêm vào và được tạo huyền phù. Tế bào được ủ tiếp ở 4°C trong 15 phút. Phân tích bào kế dạng dòng được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2, và các sơ đồ cường độ huỳnh quang PE được tạo ra (Fig.38).

Xác nhận được rằng các sơ đồ đối với tất cả các kháng thể đều dịch chuyển về phía cường độ huỳnh quang mạnh trong tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm đồng thời bằng TGF β 1 và GARP so với các sơ đồ đối với IgG đối chứng (Fig.38).

Mặt khác, các sơ đồ đối với MHG8 và LHG10 không dịch chuyển và giống với các sơ đồ đối với IgG đối chứng trong tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm đồng thời bằng TGF β 1 và thể đột biến GARP, trong khi các sơ đồ đối với các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 dịch chuyển về phía cường độ huỳnh quang mạnh trong tế bào. Do đó, chứng minh được rằng các kháng thể MHG8

và LHG10 không liên kết với thể đột biến GARP, như được mô tả trong [Tài liệu phi sáng chế 12].

Từ các kết quả nêu trên, chứng minh được rằng các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 liên kết với cả GARP và lẫn thể đột biến GARP trên tế bào biểu hiện đồng thời TGF β 1, và phát hiện ra rằng các kháng thể này liên kết với các vùng khác với các vùng mà các kháng thể MHG8 và LHG10 đã liên kết.

Ví dụ 9: liên kết với tế bào biểu hiện GARP nội sinh

9)-1 Phân tích bào kế dạng dòng bằng cách sử dụng tế bào L428

Tế bào L428 được rửa hai lần bằng đệm FACS và được tạo huyền phù trong cùng dung dịch. Sau đó, h151D-H1L1, h151D-H4L4, h198D-H3L4, và IgG người đối chứng (IgG người: Eureka Therapeutics) được thêm vào huyền phù, và tế bào được ủ ở 4°C trong 15 phút. Tế bào được rửa hai lần bằng đệm FACS, và kháng thể kháng IgG đã đánh dấu PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được thêm vào và được tạo huyền phù. Tế bào được ủ ở 4°C trong 15 phút. Phân tích bào kế dạng dòng được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 3, và các sơ đồ cường độ huỳnh quang PE được tạo ra.

Kết quả là, các sơ đồ đối với các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 dịch chuyển về phía cường độ huỳnh quang mạnh trong tế bào L428 so với các sơ đồ đối với IgG đối chứng. Do đó, xác nhận được rằng h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 đã liên kết với GARP được biểu hiện nội sinh (Fig.39).

9)-2 Phân tích bào kế dạng dòng bằng cách sử dụng Treg người

PBMC người đóng băng (Cellular Technology) được làm tan băng theo quy trình, và PBMC này được cấy ở 2×10^6 tế bào/mL trong đĩa 24 lỗ (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) bằng cách sử dụng môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS.

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life technologies) được thêm vào đĩa, và tế bào được nuôi cấy trong 48 giờ. Sau đó, tế bào được tạo huyền phù trong đệm FACS, và các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4, và IgG người đối chứng (IgG người: Eureka Therapeutics) được thêm vào. Kháng thể kháng

CD4 đã đánh dấu APC (Becton Dickinson) cũng được thêm vào huyền phù. Tế bào được ủ ở 4°C trong 10 phút.

Tế bào được rửa bằng đệm FACS, và sau đó, kháng thể kháng IgG đã đánh dấu FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) và Horizon FVS450 (Becton Dickinson) được thêm vào và được tạo huyền phù. Tế bào được ủ tiếp ở 4°C trong 15 phút.

Tế bào lại được rửa bằng đệm FACS và được tạo huyền phù lại trong dung dịch bằng cách sử dụng FoxP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec). Sau đó, kháng thể kháng Foxp3 đã đánh dấu PE (Miltenyi Biotec) được thêm vào tế bào, và tế bào được ủ ở 4°C trong 30 phút.

Sau khi rửa tế bào, tế bào được đo bằng cách sử dụng bào kế dạng dòng (FACS Canto II; Becton Dickinson). Tế bào dương tính với CD4 được phân tích bằng cách sử dụng FlowJo (Tree Star) sau khi tế bào chết được loại khỏi quá trình phân tích bằng cách cho qua cổng tế bào nhuộm Horizon FVS450.

Các kết quả này chứng minh rằng các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 liên kết với Treg dương tính với FoxP3 (Fig.40).

Ví dụ 10: Các đặc tính của kháng thể kháng GARP

10)-1 Hoạt tính ADCC

Các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4, các kháng thể đã biết (các kháng thể IgG1 người kháng GARP MHG8 và LHG10 được sản xuất trên cơ sở thông tin trình tự được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1), và IgG người đối chứng (Sigma) được phân tích về hoạt tính ADCC của chúng theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4.

Các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính làm tan tế bào đối với tế bào L428 theo cách phụ thuộc nồng độ kháng thể (Fig.41A).

Ngược lại, như được mô tả trong Ví dụ 4, MHG8 và LHG10 không biểu hiện hoạt tính làm tan tế bào như vậy theo cách giống như IgG người đối chứng không biểu hiện (Fig.41B).

Từ các kết quả nêu trên, chứng minh được rằng các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 có hoạt tính ADCC.

10)-2 Hoạt tính ức chế chức năng Treg

Các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4, và h198D-H3L4 được phân tích về hoạt tính ức chế chức năng Treg theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4. Hoạt tính ức chế của h151D-H1L1, h151D-H4L4, và h198D-H3L4 đối với chức năng Treg ở nồng độ cuối 1 $\mu\text{g/mL}$ là được thể hiện trên Fig.42 (tỷ lệ ức chế của h151D-H1L1: 81,5%; tỷ lệ ức chế của h151D-H4L4: 80,4%; và tỷ lệ ức chế của h198D-H3L4: 70,8%).

Chứng minh được rằng các kháng thể h151D-H1L1, h151D-H4L4, và h198D-H3L4 có hoạt tính ức chế chức năng Treg.

10)-3 Hoạt tính trị khối u (*in vitro*)

10)-3-1 Điều chế tế bào lympho T gây độc tế bào (Cytotoxic T lymphocytes: CTL)

Theo quy trình từ Mie University, tế bào CTL có thụ thể tế bào T đặc hiệu với NY-ESO-1 (MU28 CD8B35 Clone #7: thu được từ Mie University) được ủ ở 3×10^5 tế bào trong bình 25 cm^2 (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) với sự có mặt của kháng thể kháng CD3 (OKT3: Imgenex), IL-2 (Novartis), và tế bào nuôi trong môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung 10% huyết thanh AB nam giới (Human male AB serum, Sigma) trong 7 ngày.

Liên quan đến tế bào nuôi, PBMC người đóng băng (Cellular Technology) được làm tan băng và tế bào dương tính với CD8 được loại khỏi PBMC bằng cách sử dụng CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotech) để thu PBMC nghèo CD8 ($7,5 \times 10^6$ tế bào/bình 25 cm^2) và tế bào được chiếu xạ tia X. Ngoài ra, tế bào 103-LCL (thu được từ Riken BioResource Center) ($1,5 \times 10^6$ tế bào/bình 25 cm^2) cũng được chiếu xạ tia X bằng cách sử dụng thiết bị chiếu xạ tia X (Hitachi Medical Corporation). Các tế bào này được dùng làm tế bào nuôi.

Treg thu được bằng theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4)-2-1 được thêm vào sau khi bắt đầu nuôi cấy ($1,5 \times 10^5$ tế bào/bình 25 cm^2) để đánh giá tác dụng ức chế của Treg đối với hoạt tính tế bào CTL. Ngoài ra, Treg ($7,5 \times 10^4$ tế bào/bình 25 cm^2) thu được bằng phương pháp nêu trên và các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4, h198D-H3L4 và IgG1 người (Enzo) được thêm vào sau khi bắt đầu nuôi cấy (10 $\mu\text{g/mL}$) để đánh giá hoạt tính trị khối u của mỗi kháng thể.

Sau khi kết thúc nuôi cấy, tế bào dương tính với CD8 được tinh chế và tách để điều chế tế bào CTL bằng cách sử dụng CD8⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech). Sau đó, tế bào CTL điều chế được sử dụng trong đánh giá hoạt tính.

10)-3-2 Điều chế tế bào đích

Dòng tế bào u tủy người, tức là, tế bào SK-MEL-52 biểu hiện NY-ESO-1 (thu được từ Mie University: Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul; 77(7): 4260-4) được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường RPMI1640 (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS. Việc đánh dấu tế bào bằng ⁵¹Cr được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 4)-1-2, và tế bào được điều chỉnh đến mật độ 2×10^4 tế bào/mL. Tế bào thu được được xác định là tế bào đích.

10)-3-3 Thử nghiệm giải phóng ⁵¹Cr

Tế bào đích được phân tán trong vi đĩa đáy chữ U 96-lỗ (Costar) (50 μ L/lỗ).

Tiếp theo, tế bào CTL được thêm vào đĩa (100 μ L/lỗ), để số lượng tế bào CTL có thể gấp 16, 8, 4, hoặc 2 lần số lượng tế bào đích (tế bào CTL: tế bào đích = 16 : 1, 8 : 1, 4 : 1, hoặc 2 : 1), và tế bào được ủ trong 5% CO₂ ở 37°C trong 4 giờ. Sau đó, tế bào được xử lý theo phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 4)-1-3. Cần lưu ý rằng hoạt tính ức chế của mẫu được tính mỗi lần trong mỗi thí nghiệm. Ngoài ra, xác nhận được rằng tế bào CTL không biểu hiện hoạt tính làm tan tế bào đối với tế bào không biểu hiện NY-ESO-1.

Kết quả đo được thể hiện trên các hình vẽ Fig.43 và Fig.44.

Hoạt tính phân hủy tế bào của các tế bào CTL đối với SK-MEL-52 bị ức chế bởi Treg (Fig.43).

Mặt khác, tỷ lệ làm tan tế bào của tế bào CTL chống lại tế bào SK-MEL-52 tăng lên khi số lượng tế bào CTL tăng lên trong tế bào CTL mà các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4, hoặc h198D-H3L4 đã được thêm vào, và tương tự, tỷ lệ làm tan tế bào cao hơn rõ rệt so với tế bào CTL đối chứng mà trong đó IgG người đối chứng đã được thêm vào (Fig.44) ở tỷ lệ đích-tế bào tác động bất kỳ.

Do đó, chứng minh được rằng các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 đã ức chế hoạt tính ức chế của Treg đối với tế bào CTL, và tăng cường hoạt tính trị khối u.

10)-4 Hoạt tính trị khối u (*in vivo*)

Biết rằng tác dụng trị khối u của kháng thể dạng khảm có hoạt tính ADCC có thể có thể được đánh giá ở chuột nhắt NOD/Shi-scid, IL-2R^{null} (NOG) mà trong đó tế bào L428 đã được cấy và PBMC người được sử dụng (J Immunol. 2009 Oct 1; 183(7): 4782-91).

Tế bào L428 (DSMZ), đã được tạo huyền phù trong dung dịch trộn chứa môi trường RPMI1640 (Invitrogen) và Matrigel (Becton Dickinson) (1 : 1) ở 1×10^7 tế bào/mL, được cấy với thể tích 0,1 mL vào mô dưới da vùng nách của chuột nhắt NOG (con cái, *In vivo* Science). Ngày mà tế bào L428 được cấy được xác định là ngày 0. Vào ngày 6, chuột được chia thành các nhóm trên cơ sở giá trị thể tích khối u ($n = 6$ trong mỗi nhóm), và các nhóm sử dụng được bố trí như sau.

Đối chứng PBS 1: được sử dụng vào các ngày 6, 10, 14, 18, 22 và 26, và tương tự, PBMC người (Lot: 20140707) được sử dụng vào các ngày 6, 14 và 22

Kháng thể 105F: được sử dụng ở liều 5 mg/kg vào các ngày 6, 10, 14, 18, 22 và 26, và tương tự, PBMC người (Lot: 20140707) được sử dụng vào các ngày 6, 14 và 22

Đối chứng PBS 2: được sử dụng vào các ngày 6, 10, 14, 18, 22, và tương tự, PBMC người (Lot: 20150924) được sử dụng vào các ngày 6, 14 và 22

Kháng thể h151D-H1L1: được sử dụng ở liều 1 mg/kg vào các ngày 6, 10, 14, 18 và 22, và tương tự, PBMC người (Lot: 20150924) được sử dụng vào các ngày 6, 14 và 22

Kháng thể h151D-H4L4: được sử dụng ở liều 1 mg/kg vào các ngày 0, 6, 10, 14, 18 và 22, và tương tự, PBMC người (Lot: 20150924) được sử dụng vào các ngày 6, 14 và 22

Kháng thể h198D-H3L4: được sử dụng ở liều 1 mg/kg vào các ngày 0, 6, 10, 14, 18 và 22, và tương tự, PBMC người (Lot: 20150924) được sử dụng vào các ngày 6, 14 và 22

Mỗi kháng thể được pha loãng bằng PBS (Invitrogen) và được sử dụng cho chuột qua tĩnh mạch đuôi (10 mL/kg).

Về PBMC người, PBMC người đóng băng (Cellular Technology) được làm tan băng theo quy trình và điều chế ở 1×10^7 tế bào/mL. Tế bào điều chế được (0,2 mL) được sử dụng cho chuột qua tĩnh mạch đuôi.

Đường kính dài (mm) và đường kính ngắn (mm) của khối u được đo theo thời gian, bằng cách sử dụng thước số điện tử (Mitutoyo), và tiếp theo thể tích khối u được tính theo công thức sau.

thể tích khối u (mm³) = $1/2 \times [\text{đường kính dài của khối u}] \times [\text{đường kính ngắn của khối u}] \times [\text{đường kính ngắn của khối u}]$

Thay đổi về giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (SE) của thể tích khối u trong mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.45.

Các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính trị khối u đối với tế bào L428, so với nhóm đối chứng mà chỉ có PBMC được sử dụng. Do đó, khác biệt đáng kể được ghi nhận đối với nhóm đối chứng (105F: thử nghiệm t; và h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4: thử nghiệm so sánh đa trị Dunnett). Kết quả của phép thử khác biệt đáng kể (giá trị P) đối với ngày đo cuối cùng của các nhóm riêng rẽ (105F: Day 31; và h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4: ngày 25) cũng được thể hiện trên hình vẽ.

Do đó, các kháng thể 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 và h198D-H3L4 biểu hiện hoạt tính trị khối u trong mô hình *in vivo*.

Ví dụ 11: Phân tích Epitop của kháng thể kháng GARP

Các epitop của các kháng thể kháng GARP người (105F, 110F, h151D-H1L1, và h198D-H3L4) được phân tích bằng phép đo khối phổ trao đổi hydro-doteri.

7 mg/mL kháng thể kháng GARP người được trộn với 3 mg/mL GARP người (R&D Systems) hoặc đệm trống với các lượng bằng nhau. Thêm 9 đương lượng nước nhẹ hoặc nước nặng vào dung dịch thu được. Sau 30 giây, 480 giây, hoặc 6000 giây thêm nước, hoặc sau một đêm, thêm 100 mM axit phosphoric, 4 M Gdn-HCl và 150 mM TCEP (pH 2,5) với các lượng bằng nhau vào mẫu, để tiếp theo hỗn hợp thu được được thay thế đoteri. Mẫu đã thay thế đoteri được tiêm vào HPLC trong điều kiện lạnh, và tiếp theo nó được cấp lên cột pepsin cố định với dung dịch 0,1% TFA.

Đoạn peptit thu được bằng cách cắt GARP người trong cột pepsin được giữ lại trong cột hấp C18, tiếp theo được giải hấp bằng gradien tuyến tính gồm nước và axetonitril mà 0,1% axit formic và 0,025% TFA đã được thêm vào, và tiếp theo tách trong cột phân tích C18. Đoạn peptit tách được được đo khối phổ bằng cách sử dụng khối phổ kế thời gian bay.

Tỷ lệ thể đơteri được tính từ khối lượng của mỗi peptit. Đoạn peptit, trong đó mức giảm đáng kể về tỷ lệ thể đơteri được quan sát thấy do thêm kháng thể kháng GARP người, được nhận dạng là epitop.

Trong trường hợp của 105F, sự ức chế tỷ lệ thể đơteri được phát hiện ở các gốc axit amin tại các vị trí 366-377, 407-445, và 456-470 của GARP người nêu trong SEQ ID NO: 1, và do đó, chúng được nhận dạng là epitop.

Trong trường hợp của 110F, sự ức chế tỷ lệ thể đơteri được phát hiện ở các gốc axit amin tại các vị trí 54-112 và 366-392 của GARP người nêu trong SEQ ID NO: 1, và do đó, chúng được nhận dạng là epitop.

Trong trường hợp của h151D-H1L1, sự ức chế tỷ lệ thể đơteri được phát hiện ở các gốc axit amin tại các vị trí 352-392 của GARP người nêu trong SEQ ID NO: 1, và do đó, chúng được nhận dạng là epitop.

Trong trường hợp của h198D-H3L4, sự ức chế tỷ lệ thể đơteri được phát hiện ở các gốc axit amin tại các vị trí 18-112 của GARP người nêu trong SEQ ID NO: 1, và do đó, chúng được nhận dạng là epitop.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể kháng GARP theo sáng chế có hoạt tính trị khối u nhờ hoạt tính ức chế chức năng Treg, thông qua hoạt tính ADCC, và do đó, được phẩm chứa kháng thể kháng GARP có thể được sử dụng làm chất trị ung thư.

Hơn nữa, sự có mặt dư thừa Treg và sự hoạt hóa nó ở các bệnh nhân bị bệnh sốt rét và nhiễm HIV biểu hiện mối tương quan với tình trạng bệnh, và việc loại bỏ Treg cảm ứng sự thoái triển mỗi bệnh trong mô hình chuột đối với các bệnh này. Do đó, tin rằng việc ức chế hữu hiệu chức năng Treg cũng có các tác dụng điều trị đối với các bệnh nhiễm khó chữa như bệnh sốt rét và HIV.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1 - Trình tự axit amin của GARP

SEQ ID NO: 2 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể 105F

SEQ ID NO: 3 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể 105F

SEQ ID NO: 4 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể 110F

SEQ ID NO: 5 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể 110F

SEQ ID NO: 6 - Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể 105F

SEQ ID NO: 7 - Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể 105F

SEQ ID NO: 8 - Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể 110F

SEQ ID NO: 9 - Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể 110F

SEQ ID NO: 10 - Môi A

SEQ ID NO: 11 - Môi B

SEQ ID NO: 12 - Môi C

SEQ ID NO: 13 - Môi D

SEQ ID NO: 14 - Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng 151D

SEQ ID NO: 15 - Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng 151D

SEQ ID NO: 16 - Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 151D

SEQ ID NO: 17 - Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 151D

SEQ ID NO: 18 - Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng 198D

SEQ ID NO: 19 - Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng 198D

SEQ ID NO: 20 - Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 198D

SEQ ID NO: 21 - Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 198D

SEQ ID NO: 22 - Trình tự nucleotit của đoạn ADN chứa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của người và trình tự mã hóa các axit amin trong vùng ổn định của chuỗi κ người

SEQ ID NO: 23 - Trình tự nucleotit của đoạn ADN chứa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của người và trình tự mã hóa các axit amin trong vùng ổn định của IgG1 người

SEQ ID NO: 24 - Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể dạng khảm của người c151D

SEQ ID NO: 25 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể dạng khảm của người c151D

SEQ ID NO: 26 - Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể dạng khảm của người c151D

SEQ ID NO: 27 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể dạng khảm của người c151D

SEQ ID NO: 28 - Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể dạng khảm của người c198D

SEQ ID NO: 29 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể dạng khảm của người c198D

SEQ ID NO: 30 - Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể dạng khảm của người c198D

SEQ ID NO: 31 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể dạng khảm của người c198D

SEQ ID NO: 32 - Trình tự nucleotit của kháng thể được nhân hóa h151D-H1

SEQ ID NO: 33 - Trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa h151D-H1

SEQ ID NO: 34 - Trình tự nucleotit của kháng thể được nhân hóa h151D-H4

SEQ ID NO: 35 - Trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa h151D-H4

SEQ ID NO: 36 - Trình tự nucleotit của kháng thể được nhân hóa h151D-L1

SEQ ID NO: 37 - Trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa h151D-L1

SEQ ID NO: 38 - Trình tự nucleotit của kháng thể được nhân hóa h151D-L4

SEQ ID NO: 39 - Trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa h151D-L4

SEQ ID NO: 40 - Trình tự nucleotit của kháng thể được nhân hóa h198D-H3

SEQ ID NO: 41 - Trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa h198D-H3

SEQ ID NO: 42 - Trình tự nucleotit của kháng thể được nhân hóa h198D-L4

SEQ ID NO: 43 - Trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa h198D-L4

SEQ ID NO: 44 - Môi F

SEQ ID NO: 45 - Môi R

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)), trong đó kháng thể này có CDRH1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 45 đến 54 nêu trong SEQ ID NO: 25, CDRH2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 69 đến 78 nêu trong SEQ ID NO: 25 và CDRH3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 118 đến 125 nêu trong SEQ ID NO: 25, và CDRL1 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 44 đến 54 nêu trong SEQ ID NO: 27, CDRL2 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 70 đến 76 nêu trong SEQ ID NO: 27 và CDRL3 gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 109 đến 117 nêu trong SEQ ID NO: 27.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó GARP là phân tử gồm có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này có vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 25, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 27.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vùng ổn định là vùng ổn định được tạo ra từ người.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 25, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 27.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này được nhân hóa.
7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này có:
vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:
 - (a) trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33,
 - (b) trình tự axit amin tại các vị trí 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 35,

(c) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (a) hoặc (b), và

(d) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (a) hoặc (b), và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

(e) trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37,

(f) trình tự axit amin tại các vị trí 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 39,

(g) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (e) hoặc (f), và

(j) trình tự axit amin bao gồm đoạn khuyết, đoạn thay thế hoặc đoạn bổ sung gồm một hoặc vài axit amin trong trình tự vùng khung không phải tại mỗi trình tự CDR trong các trình tự (e) hoặc (f).

8. Kháng thể theo điểm 6 hoặc 7, trong đó kháng thể này có:

(1) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc,

(2) vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 35, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 39.

9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6 đến 8, trong đó kháng thể này có:

(1) chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 33 và chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 35, và

(2) chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 37 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 39.

10. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6 đến 9, trong đó kháng thể này có:

(1) chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 33, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 37, hoặc

(2) chuỗi nặng có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 35, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 39.

11. Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

12. Polynucleotit theo điểm 11, trong đó polynucleotit này có polynucleotit CDRH1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 133 đến 162 nêu trong SEQ ID NO: 24, polynucleotit CDRH2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 205 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 24 và polynucleotit CDRH3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 352 đến 375 nêu trong SEQ ID NO: 24, và polynucleotit CDRL1 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 130 đến 162 nêu trong SEQ ID NO: 26, polynucleotit CDRL2 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 208 đến 228 nêu trong SEQ ID NO: 26 và polynucleotit CDRL3 gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 325 đến 351 nêu trong SEQ ID NO: 26.

13. Polynucleotit theo điểm 11 hoặc 12, trong đó polynucleotit này có polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 24, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 26.

14. Polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11 đến 13, trong đó polynucleotit này có polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 24, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 26.

15. Polynucleotit theo điểm 11 hoặc 12, trong đó polynucleotit này có:

(1) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 32 và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 34, và

(2) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 36 và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 38.

16. Polynucleotit theo điểm 11, 12 hoặc 15, trong đó polynucleotit này có:

(1) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 32, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 36, hoặc

(2) polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 408 nêu trong SEQ ID NO: 34, và polynucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 387 nêu trong SEQ ID NO: 38.

17. Polynucleotit theo điểm 11, 12, 15 hoặc 16, trong đó polynucleotit này có:

(1) polynucleotit của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 32 và polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 34, và

(2) polynucleotit của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 36 và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 38.

18. Polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11, 12 và từ 15 đến 17, trong đó polynucleotit này có:

(1) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 32, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 36, hoặc

(2) polynucleotit của chuỗi nặng gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 58 đến 1398 nêu trong SEQ ID NO: 34, và polynucleotit của chuỗi nhẹ gồm có trình tự nucleotit tại các vị trí nucleotit 61 đến 702 nêu trong SEQ ID NO: 38.

19. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 18.

20. Tế bào chủ được biến nạp vector biểu hiện theo điểm 19.

21. Phương pháp sản xuất kháng thể nghiên cứu hoặc đoạn của nó, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 20, và bước thu kháng thể nghiên cứu từ môi trường nuôi cấy thu được bởi bước nêu trên.

22. Kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất theo điểm 21.

23. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và 22, trong đó kháng thể này bao gồm một hoặc hai hoặc nhiều cải biến được chọn từ nhóm bao gồm glycosyl hóa liên kết với N, glycosyl hóa liên kết với O, xử lý đầu tận cùng N, xử lý đầu tận cùng C, khử amit, đồng phân hóa axit aspartic, oxy hóa methionin, thêm gốc methionin vào đầu tận cùng N, amit hóa gốc prolin, và chuỗi nặng bao gồm đoạn khuyết gồm một hoặc hai axit amin tại đầu tận cùng carboxyl.

24. Kháng thể theo điểm 23, trong đó một hoặc hai axit amin bị khuyết đoạn ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của nó.

25. Kháng thể theo điểm 24, trong đó một axit amin bị khuyết đoạn ở mỗi đầu tận cùng carboxyl của cả hai chuỗi nặng của nó.

26. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 25, trong đó gốc prolin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của nó còn được amit hóa.

27. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và từ 22 đến 26, trong đó cải biến mạch đường được điều hòa để tăng cường tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.

28. Kháng thể liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)), trong đó kháng thể này có vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 33 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 37.

29. Kháng thể liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)), trong đó kháng thể này có vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 136 nêu trong SEQ ID NO: 35 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 129 nêu trong SEQ ID NO: 39.

30. Kháng thể liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)), trong đó kháng thể này có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 33 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 37.

31. Kháng thể liên kết đặc hiệu với Glycoprotein-A ưu thế sao chép (Glycoprotein-A Repetitions Predominant (GARP)), trong đó kháng thể này có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 20 đến 466 nêu trong SEQ ID NO: 35 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin tại các vị trí axit amin 21 đến 234 nêu trong SEQ ID NO: 39.

32. Kháng thể theo điểm 30 hoặc 31, trong đó một hoặc hai axit amin được loại bỏ tại đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của nó.

33. Kháng thể theo điểm 32, trong đó một axit amin được loại bỏ tại mỗi đầu tận cùng carboxyl của cả hai chuỗi nặng của nó.

34. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 33, trong đó gốc prolin tại đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của nó còn được amit hóa.

35. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 28 đến 34, trong đó cải biến mạch đường được điều hòa để tăng cường tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.

36. Dược phẩm chứa ít nhất một trong số các kháng thể theo các điểm 1 đến 10 và từ 22 đến 35.

37. Dược phẩm để sử dụng trong liệu pháp điều trị khối u, chứa ít nhất một trong số các kháng thể theo các điểm 1 đến 10 và từ 22 đến 35.

38. Dược phẩm dùng để điều trị bệnh ung thư, chứa ít nhất một trong số các kháng thể theo các điểm 1 đến 10 và từ 22 đến 35.

39. Dược phẩm dùng để điều trị bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô niệu, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u nguyên bào đệm đa dạng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc

tổ, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, hoặc bệnh ung thư máu, chứa ít nhất một trong số các kháng thể theo các điểm 1 đến 10 và từ 22 đến 35.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DAIICHI SANKYO CO. LTD.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG GLYCOPROTEIN-A REPETITIONS PREDOMINANT (GARP),
POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> FP1628

<150> JP2015-187488

<151> 2015-09-24

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 662

<212> PRT

<213> Người

<400> 1

Met	Arg	Pro	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu
1			5						10					15	

Ala	Ala	Gln	His	Gln	Asp	Lys	Val	Pro	Cys	Lys	Met	Val	Asp	Lys	Lys
		20					25						30		

Val	Ser	Cys	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Val	Pro	Ser	Val	Leu	Pro
		35				40						45			

Pro	Asp	Thr	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Asn	Gln	Leu	Arg	Ser	Ile
	50					55					60				

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

Ser Thr Asn Glu Ile Ser Phe Leu Gln Pro Gly Ala Phe Gln Ala Leu
85 90 95

Thr His Leu Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala
100 105 110

Thr Ala Leu Ser Ala Gly Gly Leu Gly Pro Leu Pro Arg Val Thr Ser
115 120 125

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu
130 135 140

Leu Gly Glu Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser
145 150 155 160

Leu Thr Arg Leu Thr Arg His Thr Phe Arg Asp Met Pro Ala Leu Glu
165 170 175

Gln Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala
180 185 190

Phe Glu Gly Leu Pro Arg Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser
195 200 205

Leu Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Arg Val Leu Asp
210 215 220

Leu Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gln Pro Gln
225 230 235 240

Ala Glu Phe Gln Leu Thr Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu
245 250 255

His Phe Pro Asp Leu Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Leu
260 265 270

Ser Asn Asn Leu Ile Arg Leu Pro Thr Gly Pro Pro Gln Asp Ser Lys
275 280 285

Gly Ile His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Leu Pro Leu Ser Ala
290 295 300

Pro Ser Gly Asn Ala Ser Gly Arg Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Ile Pro Asp Ser Phe Leu Glu
325 330 335

His Leu Thr Ser Leu Cys Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg
340 345 350

Thr Phe Glu Ala Arg Arg Leu Gly Ser Leu Pro Cys Leu Met Leu Leu
355 360 365

Asp Leu Ser His Asn Ala Leu Glu Thr Leu Glu Leu Gly Ala Arg Ala

370

375

380

Leu Gly Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Gln Gly Asn Ala Leu Arg Asp
385 390 395 400

Leu Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn
405 410 415

Leu Gln Gly Asn Arg Val Ser Pro Cys Gly Gly Pro Asp Glu Pro Gly
420 425 430

Pro Ser Gly Cys Val Ala Phe Ser Gly Ile Thr Ser Leu Arg Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Val Asp Asn Glu Ile Glu Leu Leu Arg Ala Gly Ala Phe Leu
450 455 460

His Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Pro Gly Leu Glu
465 470 475 480

Val Ala Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu
485 490 495

Ala Leu Gln Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys
500 505 510

Phe Ile Cys Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His
515 520 525

Leu Pro Ala Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg
530 535 540

Asn Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu
545 550 555 560

Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys
565 570 575

Gly Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val
580 585 590

Asp Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val
595 600 605

Ser Leu Ser His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys
610 615 620

Asn Ile Asn Leu Ile Ile Ile Leu Thr Phe Ile Leu Val Ser Ala Ile
625 630 635 640

Leu Leu Thr Thr Leu Ala Ala Cys Cys Cys Val Arg Arg Gln Lys Phe
645 650 655

Asn Gln Gln Tyr Lys Ala
660

<210> 2

<211> 448

<212> PRT

<213> Người

<400> 2

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

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

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Arg Gln Leu Ala Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 217

<212> PRT

<213> Người

<400> 3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Val Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Arg Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

130

135

140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 4
<211> 453
<212> PRT
<213> Người

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Ala Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Ala Gly Gly Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

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

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

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 5

<211> 216

<212> PRT

<213> Người

<400> 5

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Ser
85 90 95

Leu Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 6

<211> 1344

<212> ADN

<213> Người

<400> 6

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtatcgggt gttagttgga atggcagtag gacgcactat
180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc cagacagagg
300

cagctggctg aatttgacta ctggggccaa ggtaccctgg tcaccgtgag ctcagcctcc
360

accaagggcc caagcgtctt ccccttgga ccttctcca agagcacctc tggcggcaca
420

gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac ccgtgaccgt gagctggaac
480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctgcagtc ctcaggactc
540

tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc
600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaattc
660

tgtgacaaaa ctacacatg cccaccctgc ccagcacctg aactcctggg gggaccctca
720

gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc
780

acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg
840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccccggg aggagcagta caacagcacg
900

taccgggtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
960

aagtgcagg tctccaacaa agccctcca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc
1020

aaaggccagc cccgggaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc
1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg
1140

gagtgggaga gcaatggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccctcc cgtgctggac
1200

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag
1260

ggcaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta caccagaag
1320

agcctctccc tgtctcccgg caaa
1344

<210> 7

<211> 651

<212> ADN

<213> Người

<400> 7

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc
60

tcctgcactg ggagcagctc caacattggg gcgggttatg ttgtacattg gtatcagcag
120

ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatgctgaca ccaatcggcc ctcaggggtc
180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc
240

cggtccgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagagggttg
300

gtgttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggtcagc ctaaggctgc ccctagcgtg
360

accctgttcc ctccttccag cgaggagctt caagctaaca aggccaccct ggtgtgtctt
420

atctctgact tctaccctgg cgctgtgacc gtggcctgga aggctgacag ctcccctgtg
480

aaggccggag tggagaccac cacacctagc aagcagtcta acaacaagta cgctgccagc
540

tcctacctga gccttaccct tgagcagtgg aagtctcaca gaagctactc ctgtcaagtg
600

accacgagg gcagcaccgt ggagaagacc gtggctccta ccgagtgttc c
651

<210> 8

<211> 1359

<212> ADN

<213> Người

<400> 8

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtcgccgga attagttgga acagtgccat cacagtctat
180

gcggactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc aaaagatgcc
300

gggggccggg atagtgggag ctactacttt gactactggg gccaaaggta cctgggtcacc
360

gtgagctcag cctccaccaa gggcccaagc gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc
420

acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaacccgtg
480

accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg
540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc
600

accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga
660

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cctgcccagc acctgaactc
720

ctggggggac cctcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc
780

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag
840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc ccgggaggag
900

cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg
960

aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa
1020

accatctcca aagccaaagg ccagccccgg gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc
1080

cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc
1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag
1260

agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac
1320

cactacaccc agaagagcct ctccctgtct cccggcaaa
1359

<210> 9

<211> 648

<212> ADN

<213> Người

<400> 9

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc
60

tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag
120

ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc
180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc
240

cgggtccgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagaagcct gaattgggtg
300

ttcggcggag gaaccaagct gacggtccta ggtcagccta aggctgcccc tagcgtgacc
360

ctgttccttc cttccagcga ggagcttcaa gctaacaagg ccaccctggg gtgtcttatc
420

tctgacttct accctggcgc tgtgaccgtg gcctggaagg ctgacagctc ccctgtgaag
480

gccggagtgg agaccaccac acctagcaag cagtctaaca acaagtacgc tgccagctcc
540

tacctgagcc ttaccctga gcagtggaag tctcacagaa gctactcctg tcaagtgacc
600

cacgagggca gcaccgtgga gaagaccgtg gctcctaccg agtggtcc
648

<210> 10

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối A

<400> 10

gaaacagcta tgaaatacct attg
24

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối B

<400> 11

gcctgagcag tggaagtcc
19

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Môi C

<400> 12
taggtatttc attatgactg tctc
24

<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Môi D

<400> 13
cccagtcacg acgttgtaaa acg
23

<210> 14
<211> 351
<212> ADN
<213> Chuột cống

<400> 14
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggaaggct caagaaactc
60

tcctgttcag cctcaggatt cacttttcagt aactattaca tggcctgggt ccgccaggct
120

ccaacgcagg gtctggagtg ggtcgcatcc attggtactg ttggtggtaa cacttactat
180

cgagactccg tgaagggccg attcactatc tccagagatg atgcaaaaag caccctatac
240

ctgcaaattg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagagaggat
300

tacggagggt ttccccactg gggccaagga gtcattggta cagtctcctc a
351

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Chuột cống

<400> 15

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

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

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

Ala	Ser	Ile	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
	50					55				60					

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

24/74

<210> 17
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Chuột cống

<400> 17

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Met Phe Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Asp Cys Leu Gln Tyr Lys Tyr Asn Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn Arg Ala
 100 105

<210> 18
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Chuột cống

<400> 18

caggtgcagc tgagggagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac cctgtccctc
60

acctgcactg tctctggggt ctcactaacc agctttcatg taagctgggt tcgccagcct
120

ccagagaagg gtctggagtg gattgcaaca atttcaagtg gtggaggtac atattataat
180

tcagctctca aatcccgact gagcatcagc agggacacct ccaagagcca agttttctta
240

aagatgagca ctctgcaaac tgaagacaca gccatgtact tctgtgcccc gatttcgggc
300

tggggccatt actatgttat ggatgtctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctca
360

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Chuột cống

<400> 19

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ser	Phe
			20					25					30		

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

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

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

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

Arg Ile Ser Gly Trp Gly His Tyr Tyr Val Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 327
<212> ADN
<213> Chuột cống

<400> 20
gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctggat ctctgggaga aactgtcacc
60

atccaatgtc aagcaagtga ggacatttac agtgggttag cgtggtatca gcagaagcca
120

gggaaatctc ctcagctcct gatctatggt gcaggtagct tacaagacgg cgtcccatca
180

cgattcagtg gcggtggatc tggcacacat tattctctca agatcagcag catgcaaact
240

gaagatgaag gggtttattt ctgtcaacag ggtttaaagt ttccgctcac gttcggttct
300

gggaccaagc tggagatcaa acgggct
327

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> Chuột cống

<400> 21

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

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

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

Tyr Gly Ala Gly Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr His Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Met Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Glu Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Leu Lys Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala

100

105

<210> 22
<211> 449
<212> ADN
<213> Người

<400> 22
gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcatct ccctgctgct
60

gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc
120

cgtgttcatc ttccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg
180

cctgctgaat aacttctacc ccagagaggg caaggtgcag tggaagggtg acaacgccct
240

gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag
300

cctgagcagc accctgaccc tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg
360

cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca ggggggagtg
420

ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta
449

<210> 23
<211> 1132
<212> ADN
<213> Người

<400> 23

gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttcctcctgc tgggtggcagc
60

tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag
120

ggcccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc
180

ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccctga cctgagctg gaactcaggc
240

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc
300

ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac
360

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagccaa atcttgtgac
420

aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tggggggacc ctcagtcttc
480

ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc
540

gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc
600

gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg
660

gtggctagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc
720

aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc
780

cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac
840

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg
900

gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ctcccgtgct ggactccgac
960

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac
1020

gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacca gaagagcctc
1080

tccctgtctc ccggcaaatt agatatcggg cccgtttaaa cgggggaggc ta
1132

<210> 24

<211> 1398

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 24

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag
60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccaa gaaactctcc
120

tgttcagcct caggattcac tttcagtaac tattacatgg cctgggtccg ccagggtcca
180

acgcagggtc tggagtgggt cgcatccatt ggtactgttg gtggtaacac ttactatcga
240

gactccgtga agggccgatt cactatctcc agagatgatg caaaaagcac cctatacctg
300

caaattggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaag agaggattac
360

ggagggtttc cccactgggg ccaaggagtc atggtcacag tcagctcagc ctccaccaag
420

ggccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc
480

ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccctga ccgtgagctg gaactcaggc
540

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc
600

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac
660

gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac
720

aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tggggggacc ctcagtcttc
780

ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc
840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc
900

gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg
960

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc
1020

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc
1080

cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac
1140

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg
1200

gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ctcccgtgct ggactccgac
1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac
1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacca gaagagcctc
1380

tccctgtctc ccggcaaa
1398

<210> 25

<211> 466

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 25

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1			5					10						15	

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Lys Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Ile Gly Thr Val Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Gly Phe Pro His Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 26

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 26

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc
60

aatattgtga tgactcagtc tcccacatcc atgttcatat cagtcggaga cagggtcacc
120

atgaactgta aggccagtca gaatgtggga actaatgtag actggtacca gcagaaaaca
180

gggcagtctc ctaaactgct tatctatggg gcgtccaacc gctacactgg agtccctgat
240

cgcttcacag gcagtggatc tggaacagat ttcactctca ccatcagcaa catgcaggct
300

gaagacctgg ctgtttatga ctgtctacag tataagtaca atccatacac gtttggaact
360

gggaccaagc tggaactgaa ccgggctgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc
420

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac
480

cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag
540

gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc
600

ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
660

ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt
702

<210> 27

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 27

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Met Phe
20 25 30

Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Gly Thr Asn Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Met Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Asp Cys Leu Gln Tyr Lys
100 105 110

Tyr Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn Arg
115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 28

<211> 1407

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 28

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag
60

gtgcagctga gggagtcagg acctggctctg gtgcagccct cacagaccct gtcctcacc
120

tgcactgtct ctgggttctc actaaccagc tttcatgtaa gctggggttcg ccagcctcca
180

gagaagggtc tggagtggat tgcaacaatt tcaagtgggt gaggtacata ttataattca
240

gctctcaaat cccgactgag catcagcagg gacacctcca agagccaagt tttcttaaag
300

atgagcactc tgcaaactga agacacagcc atgtacttct gtgcccggat ttcgggctgg
360

ggccattact atgttatgga tgtctgggggt caaggagctt cagtcactgt cagctcagcc
420

tccaccaagg gccaagcgt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggcggc
480

acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccctgac cgtgagctgg
540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctgca gtcctcagga
600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac
660

atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagcccaaa
720

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccc
780

tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag
840

gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac
900

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagcccc gggaggagca gtacaacagc
960

acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag
1020

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa
1080

gccaaaggcc agccccggga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg
1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc
1200

gtggagtggg agagcaatgg ccagccccgag aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg
1260

gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag
1320

cagggcaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacaccag
1380

aagagcctct ccctgtctcc cggcaaa
1407

<210> 29
<211> 469
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 29

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Ser Phe His Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Leu Lys Met Ser Thr Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

100 105 110

Phe Cys Ala Arg Ile Ser Gly Trp Gly His Tyr Tyr Val Met Asp Val
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 30
<211> 702
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 30
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc
60

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctggat ctctgggaga aactgtcacc
120

atccaatgtc aagcaagtga ggacatttac agtggtttag cgtggtatca gcagaagcca
180

gggaaatctc ctcagctcct gatctatggt gcaggtagct tacaagacgg cgtcccatca
240

cgattcagtg gcggtggatc tggcacacat tattctctca agatcagcag catgcaaact
300

gaagatgaag gggtttattt ctgtcaacag ggttttaaagt ttccgctcac gttcggttct
360

gggaccaagc tggagatcaa acgggctgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc
420

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac
480

cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag
540

gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc
600

ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
660

ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt
702

<210> 31

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể dạng khảm

<400> 31

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser
1				5					10						15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Gly Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Gln Cys Gln Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Gly Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr His Tyr Ser Leu Lys Ile Ser
85 90 95

Ser Met Gln Thr Glu Asp Glu Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Leu
100 105 110

Lys Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 32

<211> 1398

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 32

atgaagcacc tgtggttctt tctgctgctg gtggccgctc ccagatgggt gctgtctgaa
60

gtgcagctgg tggaatccgg cggaggcctg gtgcagcctg gcggatctct gagactgtct
120

tgtgccgcct ccggcttcac cttctccaac tactacatgg cctgggtgcg acaggcccct
180

ggcaaggac tggaatgggt gtcctctatc ggcaccgtgg gcggcaacac ctactacgcc
240

gattctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacgact ccaagaacac cctgtacctg
300

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag agaggactac
360

ggcggcttcc ctcatgggg ccagggcaca ctctgaccg tgtcctctgc ttccaccaag
420

ggccccctccg tgtttcctct ggccccctcc agcaagtcca cctctggcgg aacagccgct
480

ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcccgtga cagtgtcttg gaactctggc
540

gccctgacct ccggcgtgca cacctttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc
600

ctgtcctccg tcgtgactgt gccctccagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac
660

gtgaaccaca agccctccaa caccaagggtg gacaagcggg tggaacccaa gtcctgcgac
720

aagaccaca cctgtcccc ttgtcctgcc cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc
780

ctgttcccc caaagcctaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc
840

gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc
900

gtggaagtgc acaacgcca gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg
960

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcatcag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc
1020

aaggtgtcca acaaggccct gcctgcccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc
1080

cagccccggg aaccccaggt gtacacactg ccccctagcc gggaagagat gaccaagaac
1140

caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggaatgg
1200

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac
1260

ggctcattct tcctgtacag caagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac
1320

gtgtttctct gtcctgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccttg
1380

tccctgagcc ccggcaaa
1398

<210> 33

<211> 466

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 33

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	

Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
			20					25					30		

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Gly Thr Val Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Gly Phe Pro His Trp Gly Gln
115 120 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

340

345

350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 34

<211> 1398

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 34

atgaagcacc tgtggttctt tctgctgctg gtggccgctc ccagatgggt gctgtctgaa
60

gtgcagctgg tggaatccgg cggaggcctg gtgcagcctg gcggatctct gagactgtct
120

tgtgccgcct ccggcttcac cttctccaac tactacatgg cctgggtgcg acaggcccct
180

ggcaagggaac tggaatgggt ggcctctatc ggcaccgtgg gcggcaacac ctactaccgg
240

gattctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacgact ccaagtccac cctgtacctg
300

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag agaggactac
360

ggcggcttcc ctcatggggg ccagggcaca ctcgtgaccg tgcctctgac ttccaccaag
420

ggccccctccg tgtttcctct ggcccccttc agcaagtcta cctccggcgg aacagccgct
480

ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcccgatga cagtgtcttg gaactctggc
540

gccctgacca gcggcgtgca cacctttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc
600

ctgtcctccg tcgtgactgt gccctccagc tctctgggca cccagacctc catctgcaac
660

gtgaaccaca agccctccaa caccaaggtg gacaagcggg tggaacccaa gtcctgcgac
720

aagaccaca cctgtccccc ttgtcctgcc cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc
780

ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc
840

gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc
900

gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg
960

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcatcag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc
1020

aaggtgtcca acaaggcctt gcctgcccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc
1080

cagccccggg aaccccaggt gtacacactg cccctagcc gggaagagat gaccaagaac
1140

caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggaatgg
1200

gagtccaacg gccagcctga gaacaactac aagaccacc cccctgtgct ggactccgac
1260

ggctcattct tcctgtacag caagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac
1320

gtgttctcct gtcctgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg
1380

tccctgagcc ccggcaaa
1398

<210> 35
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 35

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Ile Gly Thr Val Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Gly Phe Pro His Trp Gly Gln
115 120 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 36
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 36
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcctacggc
 60

aacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagagccacc
 120

atcaactgca aggctccca gaacgtgggc accaacgtgg actggtatca gcagaagccc
 180

ggccagtccc ctaagctgct gatctacggc gccagcaacc ggtacaccgg cgtgcccgat
 240

agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttaccctga caatcagctc tctgcaggcc
 300

gaggacgtgg ccgtgtacga ctgcctgcag tacaagtaca acccctacac cttcggccag
360

ggcacaaagg tggaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgtttat cttcccaccc
420

tccgacgagc agctgaagtc cggcacagct tccgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac
480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag
540

gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc
600

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc
660

ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gc
702

<210> 37

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 37

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser
1				5					10					15	

Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala
			20					25					30		

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Gly Thr Asn Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Asp Cys Leu Gln Tyr Lys
100 105 110

Tyr Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 38

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 38

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcctacggc
60

aacatcgtga tgaccagtc cccctccagc ctgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc
120

atcaactgca aggcctccca gaacgtgggc accaacgtgg actggtatca gcagaagccc
180

ggcaagtccc ccaagctgct gatctacggc gccagcaaca gatacaccgg cgtgcccgac
240

agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttaccctga ccatcagctc cctgcagccc
300

gaggacttcg ccacctacga ctgcctgcag tacaagtaca acccctacac cttcggccag
360

ggcacaaagg tggaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgtttat cttcccaccc
420

tccgacgagc agctgaagtc cggcacagct tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac
480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag
540

gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc
600

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc
660

ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gc
702

<210> 39

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 39

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser
1				5					10					15	

Gly	Ala	Tyr	Gly	Asn	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
			20					25					30		

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Gly Thr Asn Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Asp Cys Leu Gln Tyr Lys
100 105 110

Tyr Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 40

<211> 1407

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 40

atgaagcacc tgtggttctt tctgctgctg gtggccgctc ccagatgggt gctgtctgaa
 60

gtgcagctgg tggaatccgg cggaggcctc gtgaagcctt cccagaccct gtctctgacc
 120

tgcaccgtgt ccggcttctc cctgacctcc ttccacgtgt catgggtgcg acagcctcca
 180

ggcaagggcc tggaatggat cgccaccatc tcctctggcg gcggaaccta ctacaacccc
 240

agcctgaagt ccagagtgac catctcccgg gacacctcca agaaccaggt gtccctgaag
 300

ctgtcctccg tgaccgccgc tgataccgcc gtgtactact gcgccagaat ctccggctgg
360

ggccactact acgtgatgga cgtgtggggc cagggcaccc tcgtgacagt gtcctctgct
420

tccaccaagg gcccctccgt gtttcctctg gccccttcca gcaagtctac ctccggcgga
480

acagccgctc tgggctgcct cgtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttg
540

aactctggcg ctctgaccag cggcgtgcac acctttccag ctgtgctgca gtcctccggc
600

ctgtactccc tgtccagcgt cgtgactgtg ccctccagct ctctgggcac ccagacctac
660

atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaagggtg acaagcgggt ggaacccaag
720

tcctgcgaca agaccacac ctgtccccct tgtcctgccc ctgaactgct gggcggacct
780

tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatctcccg gacccccgaa
840

gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac
900

gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccta gagaggaaca gtacaactcc
960

acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag
1020

tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg cctgccccca tcgaaaagac catcagcaag
1080

gccaaagggcc agccccggga accccaggtg tacacactgc cccctagccg ggaagagatg
1140

acaaaaaatc aggtgtcact gacctgtctc gtgaagggtt tctaccctc cgatatcgcc
1200

gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg
1260

gactccgacg gctcattctt cctgtacagc aagctgacag tggacaagtc ccggtggcag
1320

cagggaacg tggttctcctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag
1380

aagtcctgt ccctgagccc cggcaaa
1407

<210> 41

<211> 469

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 41

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1			5					10						15	

Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys
			20					25					30		

Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
			35				40					45			

Thr Ser Phe His Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ile Ser Gly Trp Gly His Tyr Tyr Val Met Asp Val
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 42

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 42

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcctacggc
60

gacatccaga tgaccagag cccttcagc ctgtccgctt ccgtgggcga cagagtgacc
120

atcacctgtc aggcctccga ggacatctac tccggcctgg cctggtatca gcagaagccc
180

ggcaagtccc ccaagctgct gatctacggc gctggatctc tgcaggacgg cgtgccctct
240

agattctccg gctctggatc cggcacccac tacaccctga ccattctccag cctgcagccc
300

gaggacttcg ctacctactt ctgtcagcaa ggcctgaagt tccccctgac cttcggccag
360

ggcaccaagg tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgtttat cttcccaccc
420

tccgacgagc agctgaagtc cggcacagct tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac
480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag
540

gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc taccctgacc
600

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc
660

ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gc
702

<210> 43
<211> 234
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng thể được nhân hóa

<400> 43

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Gly Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Leu
100 105 110

Lys Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 44
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mối F

<400> 44
cacggcaacc tgctggagcg gctgctgggg gagg
34

<210> 45
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi R

<400> 45
caggctgttc ccagacaggt ccag
24

Fig.1

Trình tự axit amin của GARP (SEQ ID NO: 1)

MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPDDTETLDLSGNQLR
SILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATASAGGLGPLP
RVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLM
DIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWL
DLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNAS
GRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSH
NALETLELGARALGSLRTLTLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPS
GCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVL
ALQGNGLMVLQVDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGG
LETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDTQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEK
GGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA

Fig.2

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể 105F (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDIYMSWIRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQRQLAEFDYWGGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALH
NHYTQKSLSLSPGK

Fig.3

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể 105F (SEQ ID NO: 3)

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYVHWHYQQLPGTAPKLLIYADTNRPSPGVPD
RFGSGKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLST
PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Fig.4

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể 110F (SEQ ID NO: 4)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAGISWNSAITVYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDAGGRYSGSYFDYWGQGT LVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig.5

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể 110F (SEQ ID NO: 5)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPD
RFGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCYQSYDRSLNWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT
EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Fig.6

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể 105F (SEQ ID NO: 6)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCACTATGCAGAC
TCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCCAGACAGAGGCAGCTGGCTG
AATTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
AGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
GCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAA
GACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

Fig.7

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể 105F (SEQ ID NO: 7)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC
CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATTGGGGCGGGTTATGTTGTACATTGGTATCAGCAGCTCC
CAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGCTGACACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGA
GGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGAGGTTGGGTGTTCTGGCG
GAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTGAGCCTAAGGCTGCCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCT
CCTTCCAGCGAGGAGCTTCAAGCTAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTTATCTCTGACTTCTA
CCCTGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGACAGCTCCCCCTGTGAAGGCCGGAGTGGAGA
CCACCACACCTAGCAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCCAGCTCCTACCTGAGCCTTACC
CCTGAGCAGTGGAAGTCTCACAGAAGCTACTCCTGTCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGT
GGAGAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTTCC

Fig.8

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể 110F (SEQ ID NO: 8)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCGGAATTAGTTGGAACAGTGCCATCACAGTCTATGCGGAC
TCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGATGCCGGGGGCCGGT
ATAGTGGGAGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTGAGCTCAGCC
TCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCAC
AGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAC
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
AACTCACACATGCCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC
TTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCC
CGAGAACAAC TACAAGACCACCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

Fig.9

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể 110F (SEQ ID NO: 9)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC
CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCC
CAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGA
GGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGAAGCCTGAATTGGGTGTTCCGGCGGAG
GAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTCAGCCTAAGGCTGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCT
TCCAGCGAGGAGCTTCAAGCTAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTTATCTCTGACTTCTACCC
TGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGACAGCTCCCCTGTGAAGGCCGGAGTGGAGACCA
CCACACCTAGCAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCCAGCTCCTACCTGAGCCTTACCCCT
GAGCAGTGGAAGTCTCACAGAAGCTACTCCTGTCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGA
GAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTTCC

7/35

Fig. 10

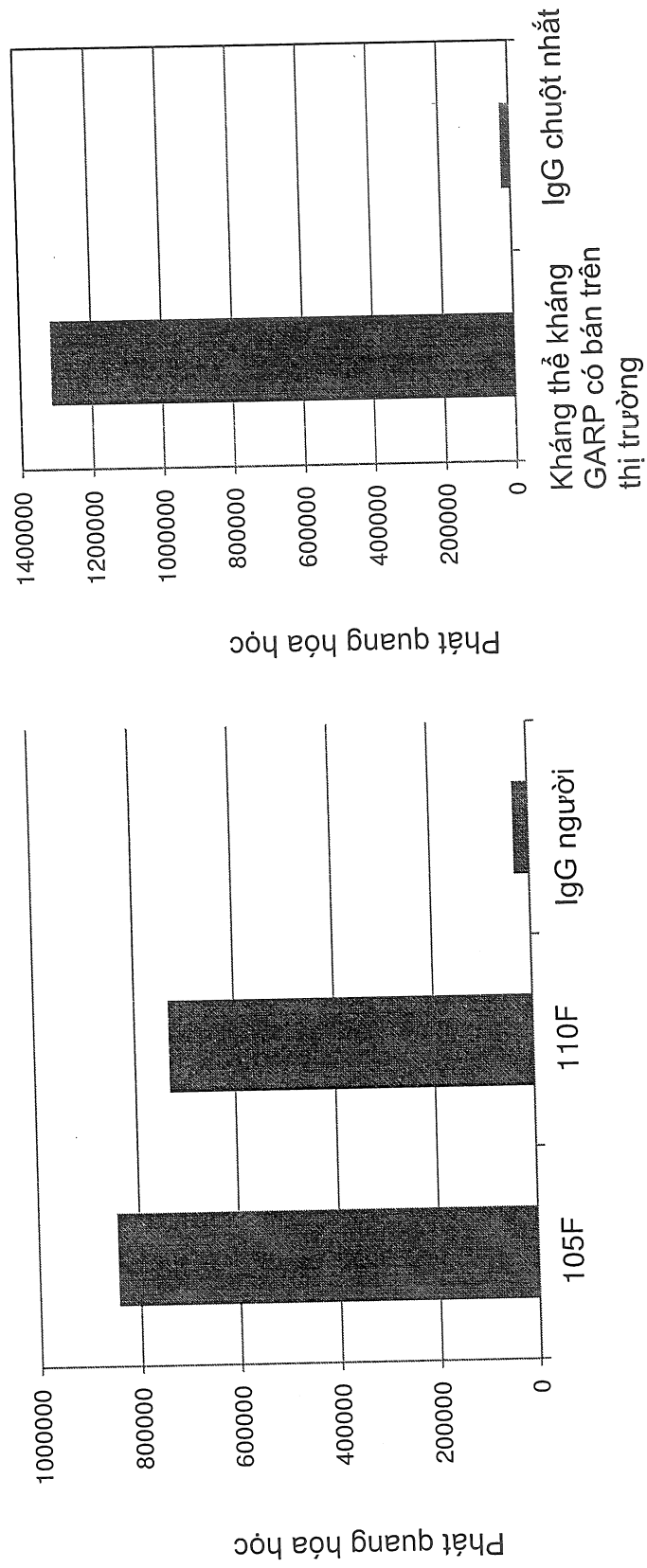


Fig. 11

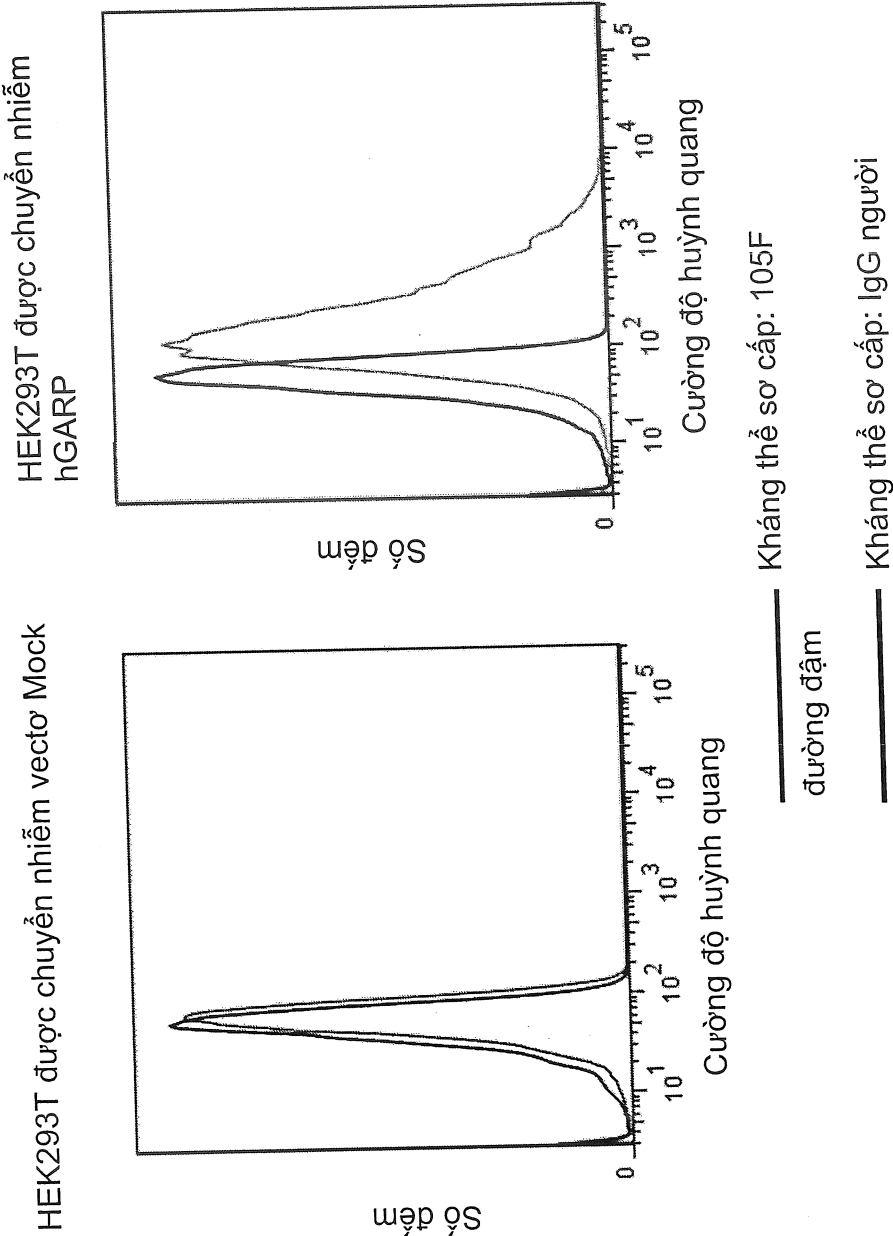


Fig. 12

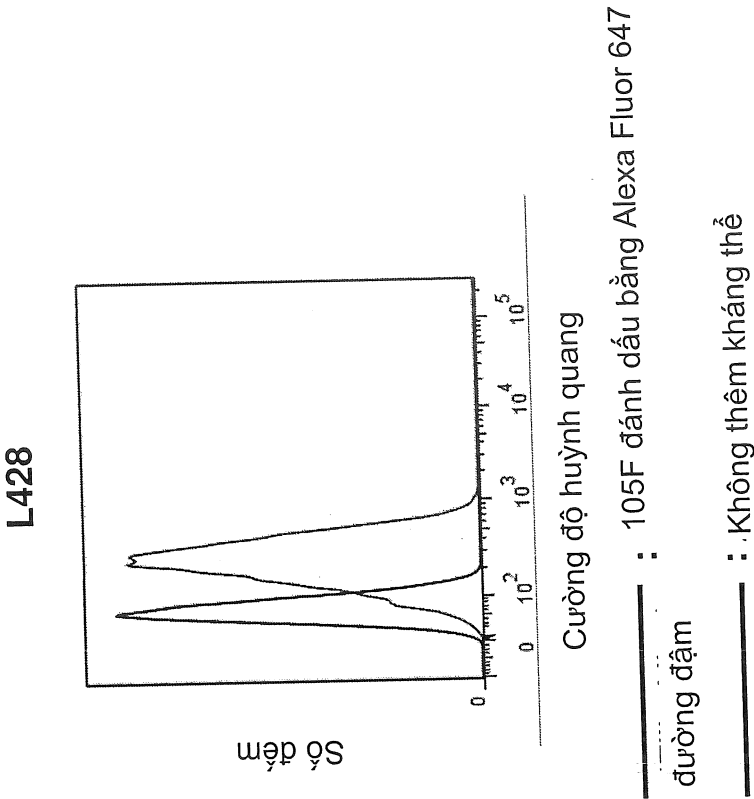
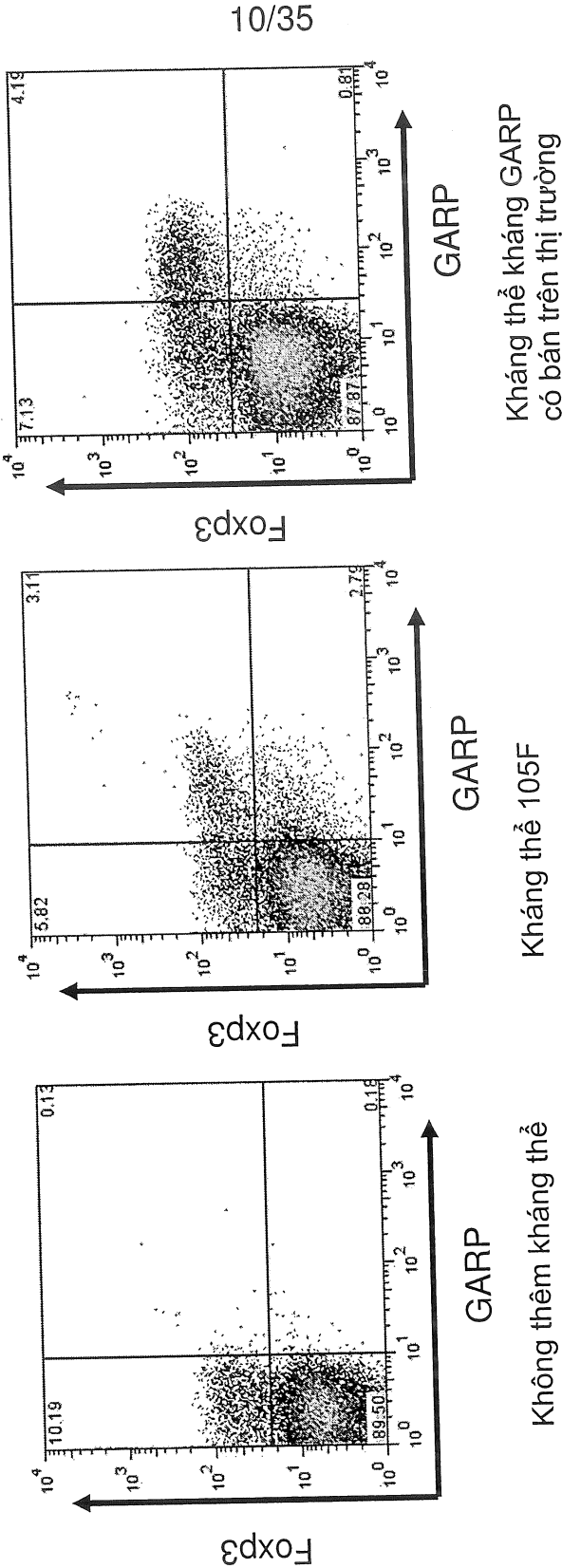


Fig. 13



11/35

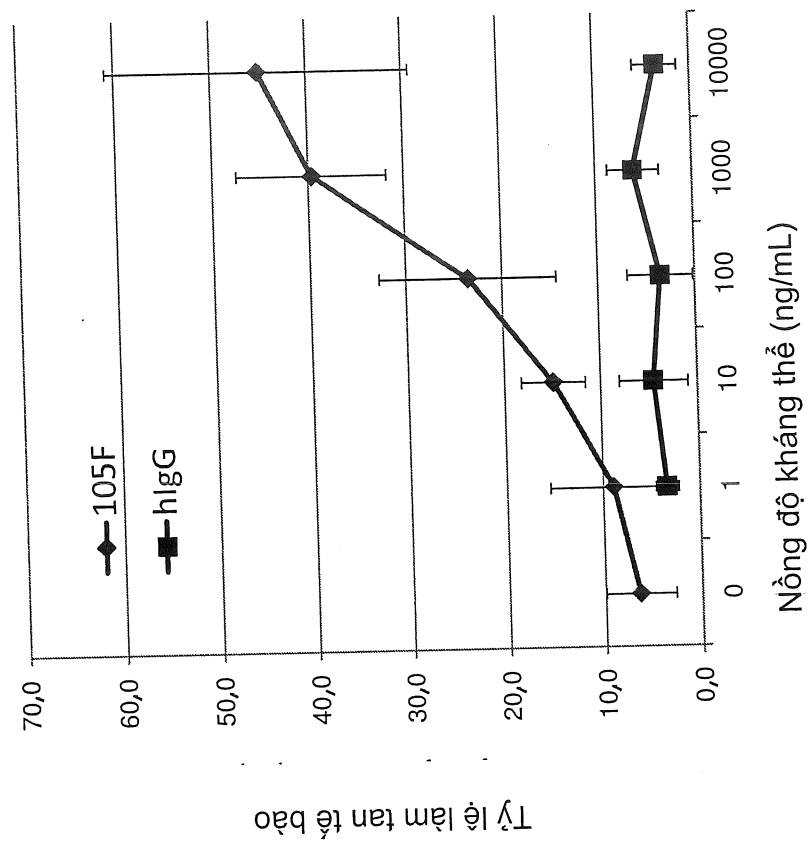
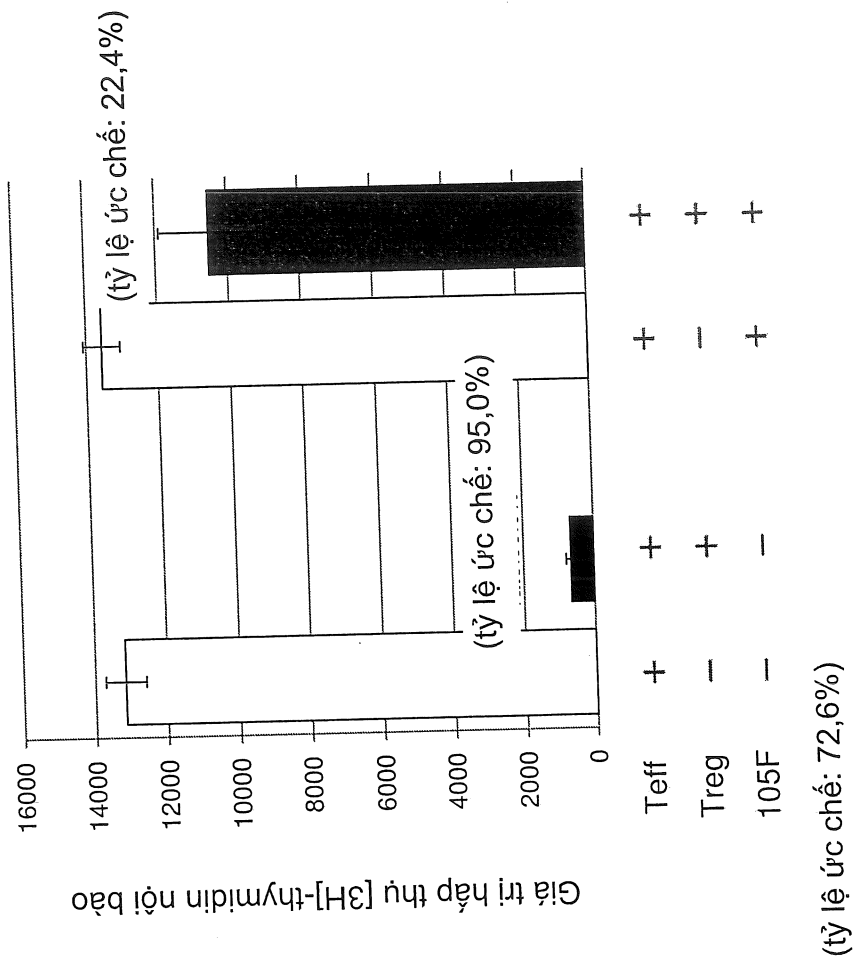


Fig. 14

12/35

Fig. 15



13/35

Fig. 16

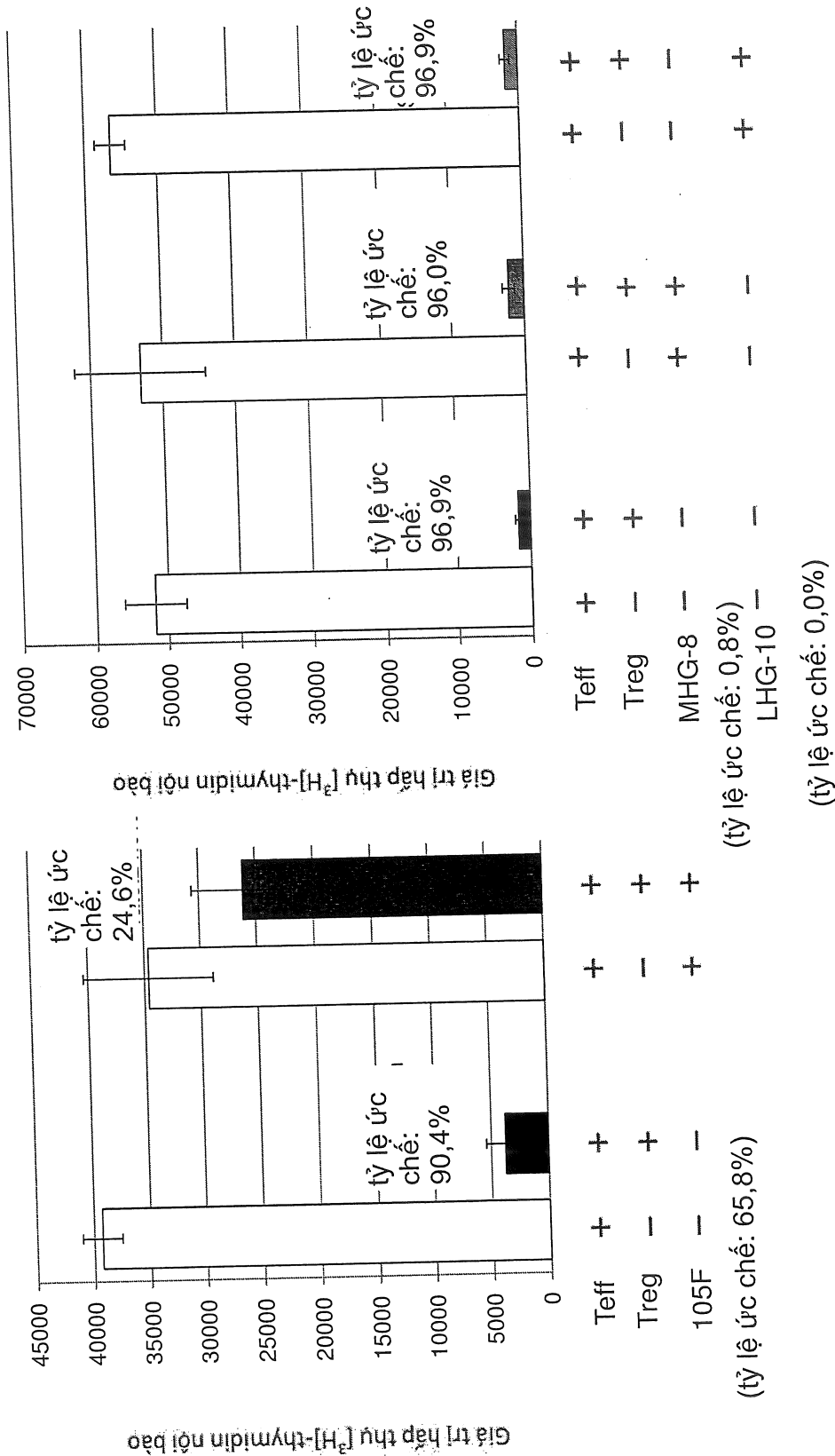


Fig.17

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể c151D (SEQ ID NO: 25)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGRSKKLSCSASGFTFSNYMAWVRQAPTQ
GLEWVASIGTVGGNTYYRDSVKGRFTISRDDAKSTLYLQMDSLRSEDATYYCAREDYGGFP
HWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLLSPGK

Fig.18

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể c151D (SEQ ID NO: 27)

SEQ ID NO: 27: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể người dạng khảm c151D

SPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQAEDLAVYDCLQYKNPYTFGTGTKL
ELNRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig.19

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể c198D (SEQ ID NO: 29)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLRESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSFHVSWVRQPPEK
GLEWIASISGGGTYYNSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMSTLQTEDTAMYFCARISGWGHYY
VMDVWGQGASVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15/35

Fig.20

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể c198D (SEQ ID NO: 31)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPASLSGSLGETVTIQCQASEDIYSGLAWYQQKPGK
SPQLLIYGAGSLQDGVPSRFSGGSGTHYSLKISSMQTEDEGVYFCQQGLKFPLTFGSGTKL
EIKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig.21

Trình tự axit amin của chuỗi nặng h151D-H1 (SEQ ID NO: 33)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGK
GLEWVSSIGTVGGNTYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGGFP
HWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig.22

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ h151D-L1 (SEQ ID NO: 37)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGNIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQNVGTNVDWYQQKPGQ
SPKLLIYGASNRYTGPVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVDCLQYKYNPYTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig.23

Trình tự axit amin của chuỗi nặng h151D-H4 (SEQ ID NO: 35)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGK
GLEWVASIGTVGGNTYYRDSVKGRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGGFP
HWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig.24

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ h151D-L4 (SEQ ID NO: 39)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGNIVMTQSPSSLSASVGDRVTINCKASQNVGTNVDWYQQKPGK
SPKLLIYGASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYDCLQYKYNPYTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig.25

Trình tự axit amin của chuỗi nặng h198D-H3 (SEQ ID NO: 41)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTSFHVSWVRQPPGK
GLEWIATISSGGGTYYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARISGWGHYY
VMDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig.26

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ h198D-L4 (SEQ ID NO: 43)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYSGLAWYQQKPGK
SPKLLIYGAGSLQDGVPSRFSGSGSGTHYTLTISLQPEDFATYFCQQGLKFPLTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig.27

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể c151D (SEQ ID NO: 24)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGT
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCAAGAACTCTCCTGTT
CAGCCTCAGGATTCACTTTCAGTAACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGCAG
GGTCTGGAGTGGGTGCGATCCATTGGTACTGTTGGTGGTAACACTTACTATCGAGACTCCGT
GAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATGATGCAAAAAGCACCCCTATACCTGCAAATGGACA
GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGAGAGGATTACGGAGGGTTTCCC
CACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTT
CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCCGTGTCTTGCAAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCCTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCC
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCC
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

[Figure 28]

Nucleotide sequence of c151D antibody light chain (SEQ ID NO: 26)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCAA
TATTGTGATGACTCAGTCTCCCACATCCATGTTTCATATCAGTCGGAGACAGGGTCACCATGA
ACTGTAAGGCCAGTCAGAATGTGGGAACTAATGTAGACTGGTACCAGCAGAAAACAGGGCAG
TCTCCTAAACTGCTTATCTATGGGGCGTCCAACCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAC
AGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACATGCAGGCTGAAGACCTGG
CTGTTTATGACTGTCTACAGTATAAGTACAATCCATACACGTTTGGAACCTGGGACCAAGCTG
GAACTGAACCGGGCTGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGA
GCTTCAACAGGGGGGAGTGT

Fig.29

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể c198D (SEQ ID NO: 28)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGT
GCAGCTGAGGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCCCTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCA
CTGTCTCTGGGTTCTCACTAACCAGCTTTCATGTAAGCTGGGTTCGCCAGCCTCCAGAGAAG
GGTCTGGAGTGGATTGCAACAATTTCAAGTGGTGGAGGTACATATTATAATTAGCTCTCAA
ATCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAGATGAGCACTC
TGCAAACCTGAAGACACAGCCATGTACTTCTGTGCCCCGGATTTCTGGGCTGGGGCCATTACTAT
GTTATGGATGTCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTCACTGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
AAGCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC
CCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACCTACA
AGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

Fig.30

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể c198D (SEQ ID NO: 30)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGA
CATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGGATCTCTGGGAGAACTGTCACCATCC
AATGTCAAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGGTTTAGCGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAA
TCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAGGTAGCTTACAAGACGGCGTCCCATCACGATTCAG
TGGCGGTGGATCTGGCACACATTATTCTCTCAAGATCAGCAGCATGCAAAGTGAAGATGAAG
GGGTTTATTTCTGTCAACAGGGTTTAAAGTTTCCGCTCACGTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTG
GAGATCAAACGGGCTGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGA
GCTTCAACAGGGGGGAGTGT

Fig.31

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng h151D-H1 (SEQ ID NO: 32)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT
GCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTG
CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAATACTACATGGCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAG
GGACTGGAATGGGTGTCCTCTATCGGCACCGTGGGCGGCAACACCTACTACGCCGATTCTGT
GAAGGGCCGGTTACACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACT
CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGACTACGGCGGCTTCCCT
CATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTT
TCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTG
CACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGCTGACTGT
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA
CCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT
CCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCTAAGGACAC
CCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC
CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCAACGCCAAGACCAAGCCT
AGAGAGGAACAGTACAATACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT
AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCC
CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCAACC
CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC
CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

Fig.32

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ h151D-L1 (SEQ ID NO: 36)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCAA
CATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCA
ACTGCAAGGCCTCCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAG
TCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACCGGTACACCGGCGTGCCCGATAGATTCTC
CGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGACGTGG
CCGTGTACGACTGCCTGCAGTACAAGTACAACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAGGTG
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACAGCTTCCGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

Fig.33

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng h151D-H4 (SEQ ID NO: 34)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT
GCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTG
CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACACTACTACATGGCCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGCAAG
GGAAGTGGAAATGGGTGGCCTCTATCGGCACCGTGGGCGGCAACACCTACTACCGGGATTCTGT
GAAGGGCCGGTTACACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGTCCACCCTGTACCTGCAGATGAAGT
CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGACTACGGCGGCTTCCCT
CATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTT
TCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGCTGACTGT
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA
CCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT
CCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCACCCCAAGCCCAAGGACAC
CCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC
CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
AGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCTGCATCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT
AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCC
CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCC
CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC
CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

Fig.34

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ h151D-L4 (SEQ ID NO: 38)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCAA
CATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA
ACTGCAAGGCCTCCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAG
TCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGATACACCGGCGTGCCCGACAGATTCTC
CGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCG
CCACCTACGACTGCCTGCAGTACAAGTACAACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGGTG
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

25/35

Fig.35

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng h198D-H3 (SEQ ID NO: 40)

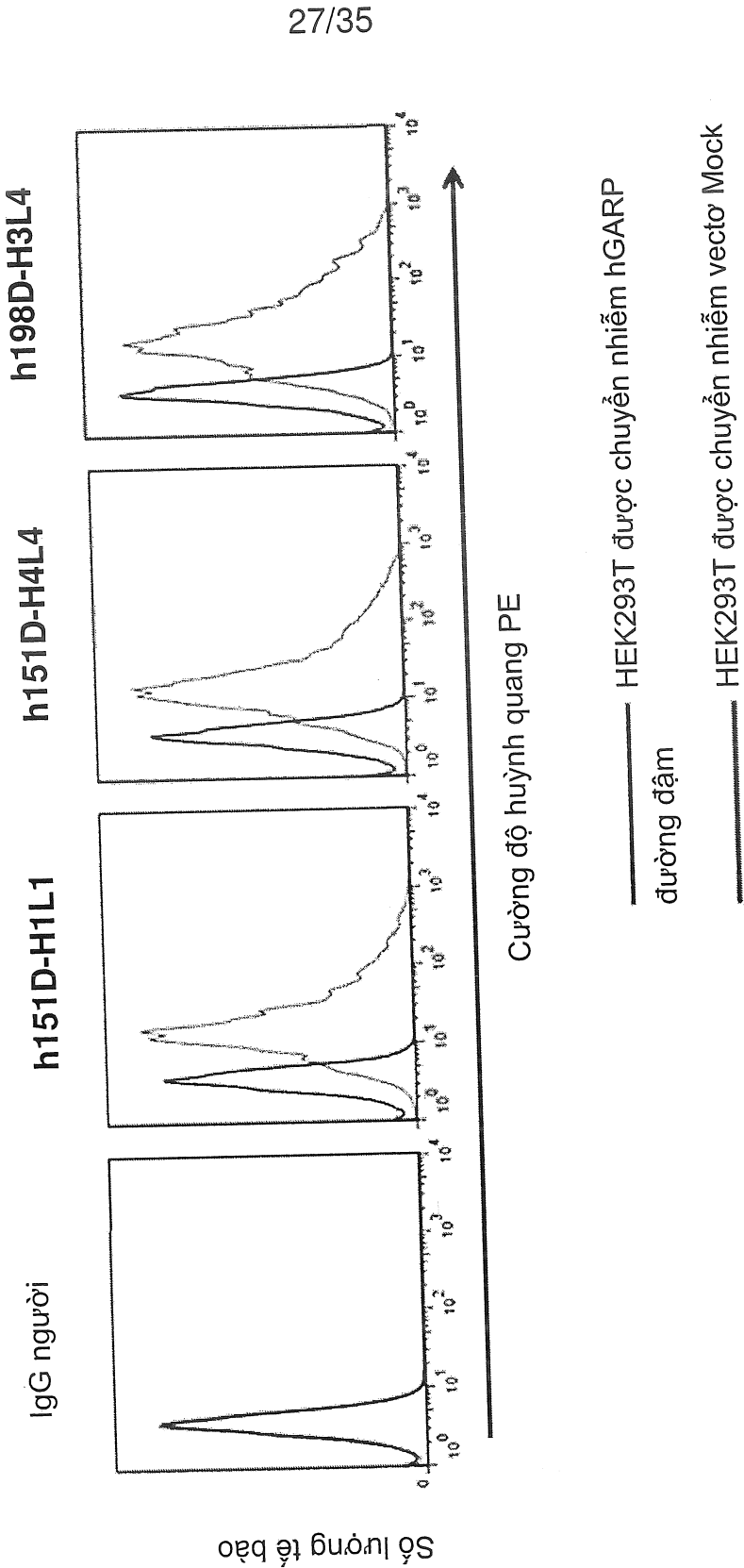
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT
GCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGCCTCGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGTCTCTGACCTGCA
CCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCTCCTTCCACGTGTCATGGGTGCGACAGCCTCCAGGCAAG
GGCCTGGAATGGATCGCCACCATCTCCTCTGGCGGCGGAACCTACTACAACCCCAGCCTGAA
GTCCAGAGTGACCATCTCCCGGGACACCTCCAAGAACCAGGTGTCCCTGAAGCTGTCCTCCG
TGACCGCCGCTGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATCTCCGGCTGGGGCCACTACTAC
GTGATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCC
CTCCGTGTTTCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCT
GCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAGCGT
CGTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC
CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGT
CCCCCTTGTCCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCC
CAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC
ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG
CCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACA
CTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACAAAAAATCAGGTGTCACTGACCTGTCTCGTGAAGGG
CTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACA
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTG
GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

Fig.36

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ h198D-L4 (SEQ ID NO: 42)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCGA
CATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA
CCTGTCAGGCCTCCGAGGACATCTACTCCGGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAG
TCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCTGGATCTCTGCAGGACGGCGTGCCCTCTAGATTCTC
CGGCTCTGGATCCGGCACCCACTACACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG
CTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCCTGAAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTG
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCTACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

Fig. 37



28/35

Fig. 38

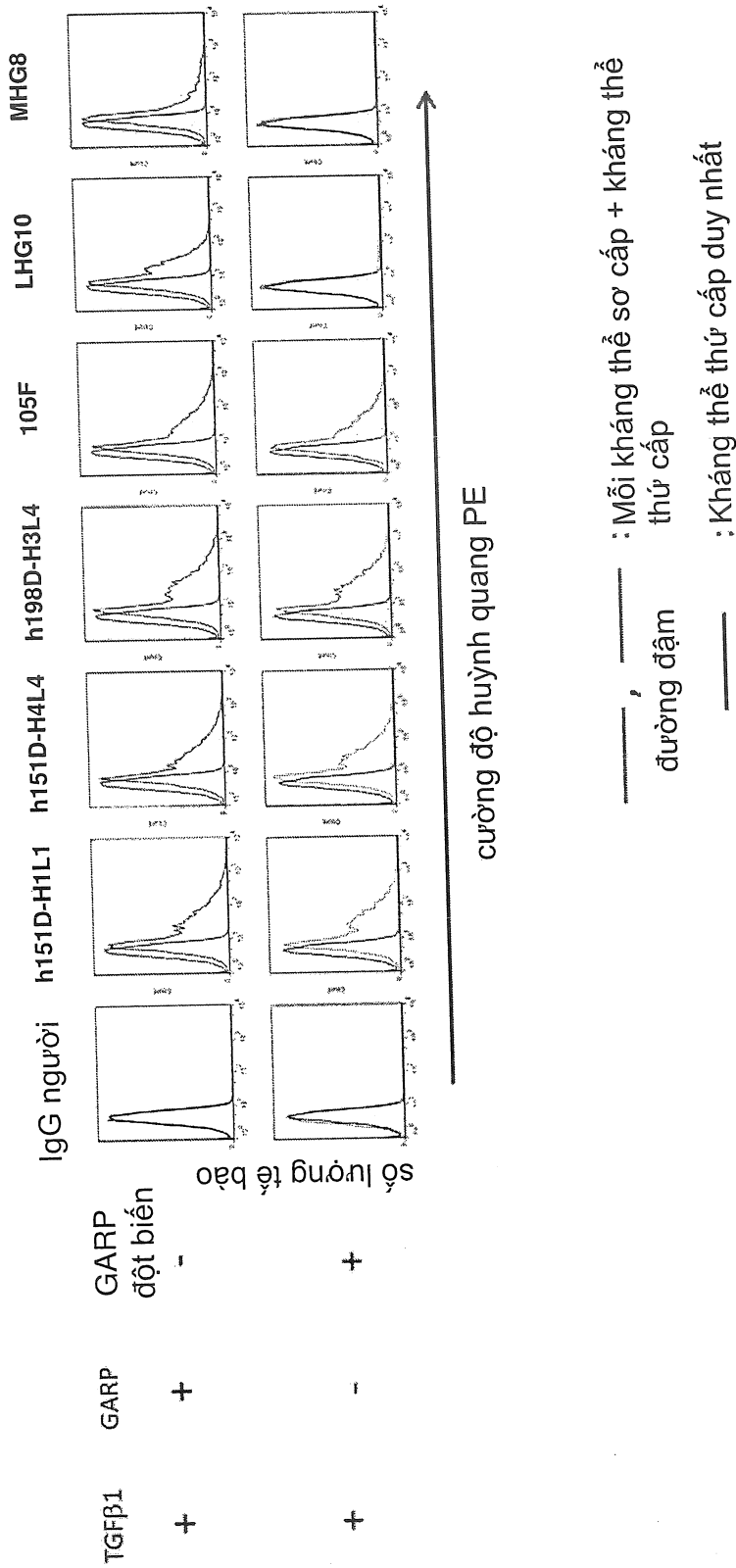
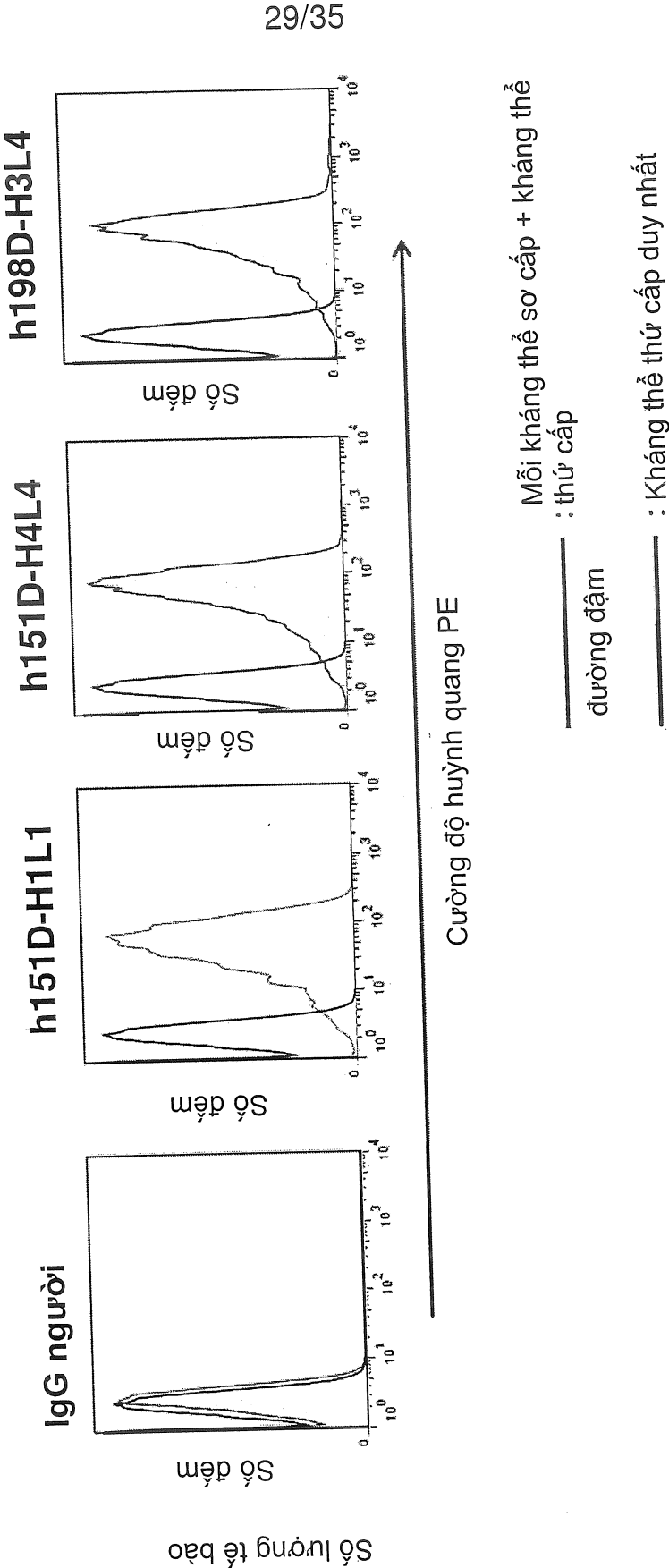


Fig. 39



30/35

Fig. 40

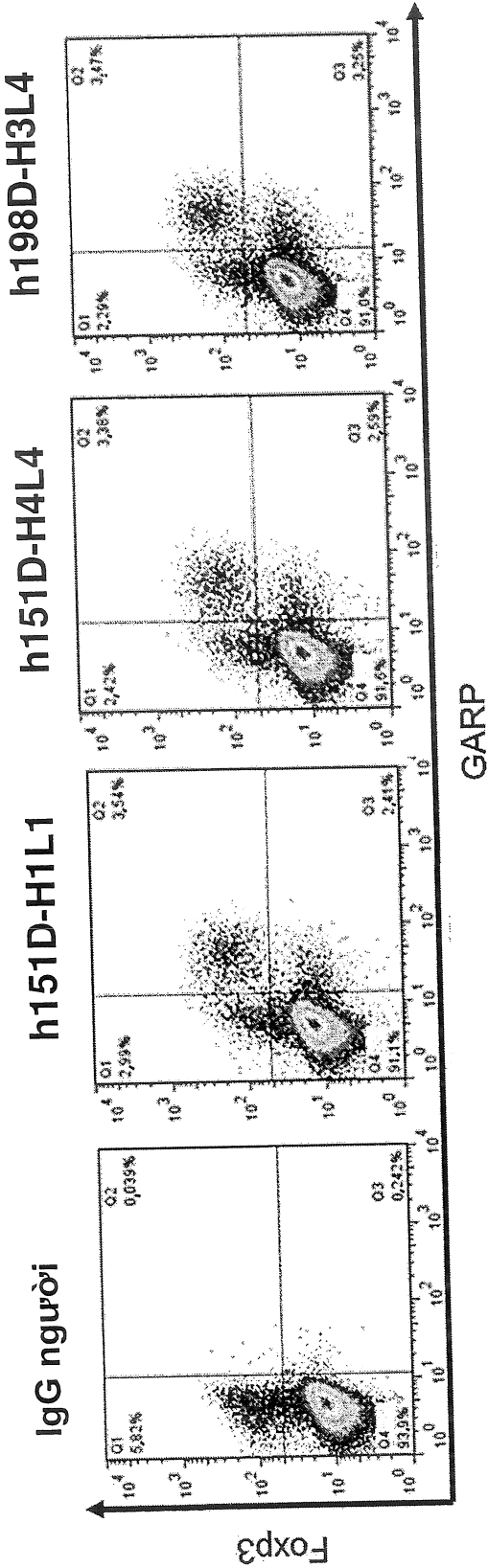


Fig. 41

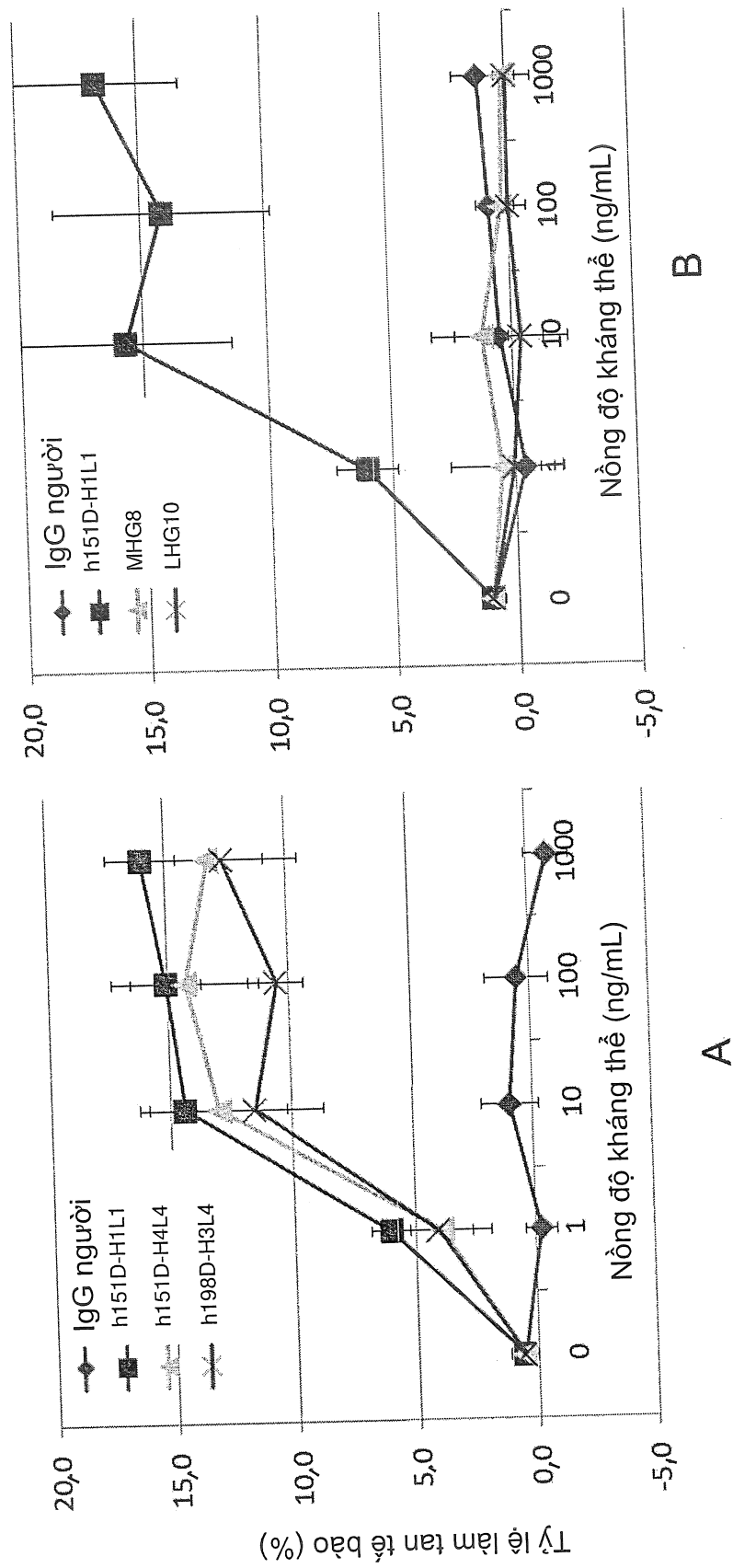
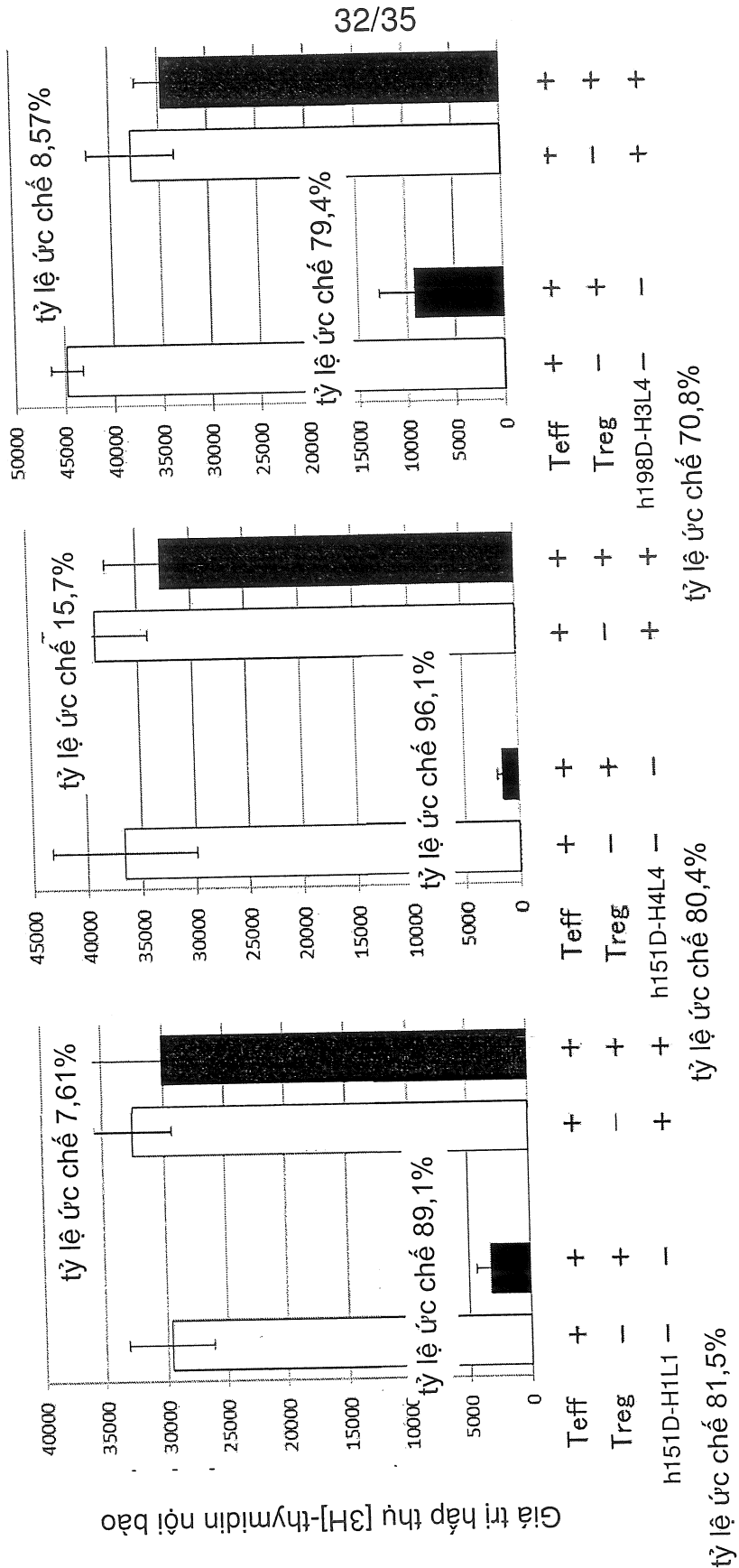


Fig. 42



33/35

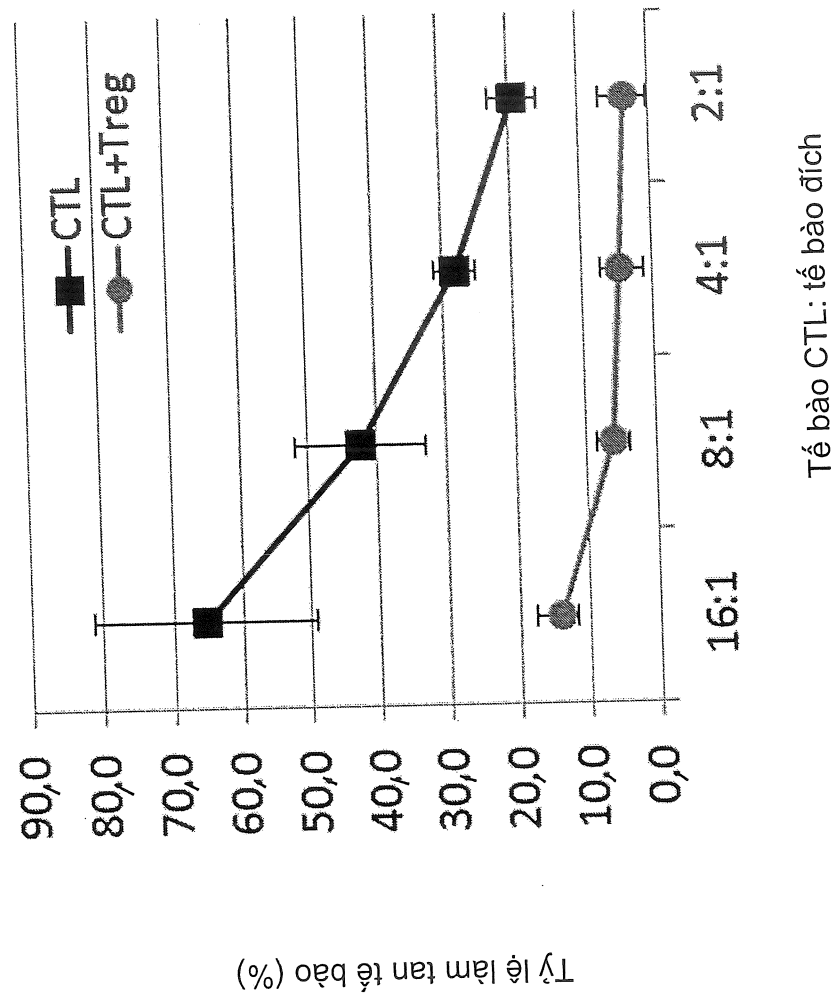


Fig. 43

34/35

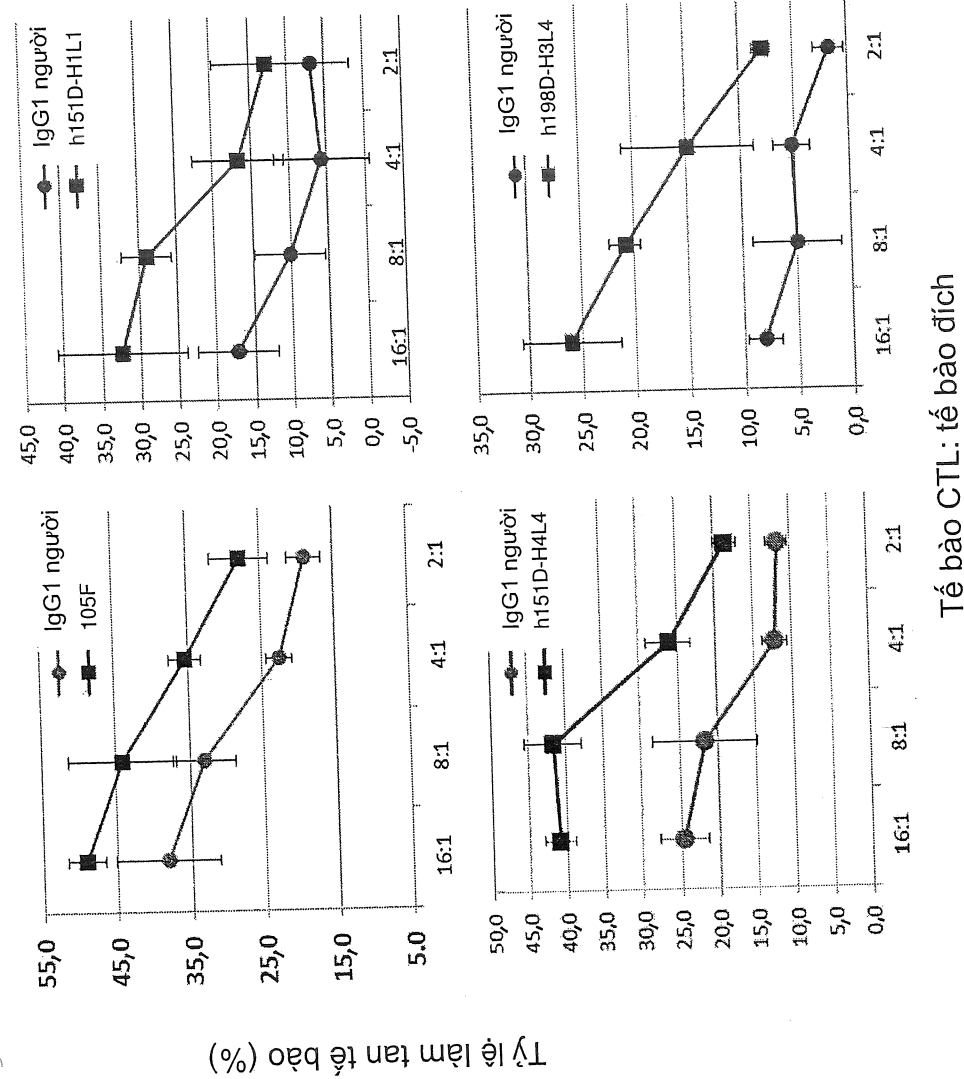


Fig. 44

Fig. 45

