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

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)** (11) **1-0019873**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(51)[7] **C07K 16/28**, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/50, 33/574 (13) **B**

(21) 1-2011-02484 (22) 17.02.2010
(86) PCT/US2010/024407 17.02.2010 (87) WO2010/096434 26.08.2010
(30) 12/388,504 18.02.2009 US
(45) 25.10.2018 367 (43) 25.05.2012 290
(73) LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD. (CH)
Stadelhoferstrasse 22 CH-8001 Zurich, Switzerland
(72) OLD, LLOYD J. (US), JONHS, Terrance, Grant (AU), PANOUSIS, Con (AU), SCOTT Andrew, Mark (AU), RENNER, Christoph (DE), RITTER, Gerd (DE), JUNGBLUTH, Achim (DE), STOCKERT, Elizabeth (AT), COLLINS, Peter (IE), CAVENEE, Webster, K. (US), HUANG, Huei-Jen Su (US), BURGESS, Antony Wilks (AU), NICE, Edouard, Collins (AU), MURRAY, Anne (US), MARK, George (US)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC KHÁNG THỤ THỂ YẾU TỐ SINH TRƯỞNG BIỂU MÔ, KIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các phần tử liên kết đặc hiệu, cụ thể là các kháng thể và mảnh của nó, mà liên kết đặc hiệu với dạng khuếch đại của EGFR và dạng d2-7 EGFR cắt cụt của EGFR. Cụ thể, epitop được nhận biết bởi các phần tử liên kết đặc hiệu, cụ thể là kháng thể và mảnh của nó, được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường. Các phần tử liên kết đặc hiệu này là hữu dụng để chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư. Các phần tử liên kết theo sáng chế cũng có thể được dùng để điều trị phối hợp với chất hóa trị liệu hoặc các chất chống ung thư và/hoặc với kháng thể hoặc các mảnh kháng thể khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phần tử liên kết đặc hiệu, cụ thể là đề cập đến các kháng thể và các mảnh của nó, mà liên kết đặc hiệu với dạng khuếch đại của thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu mô (epidermal growth factor receptor: EGFR) và dạng cắt bỏ trong khung từ 2 đến 7 exon của EGFR, tạo ra thụ thể EGFR bị cắt cụt và loại 267 axit amin ra khỏi vùng ngoại bào (de2-7 EGFR). Cụ thể, epitop được nhận diện bởi các phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là kháng thể và các mảnh của nó, được tăng cường hoặc cải thiện khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường. Các phần tử liên kết đặc hiệu này hữu dụng để chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư. Các phần tử liên kết theo sáng chế có thể cũng được dùng để điều trị phối hợp với các chất hóa trị liệu hoặc các chất chống ung thư và/hoặc với kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc điều trị bệnh tăng sinh, cụ thể là bệnh ung thư, bằng phương pháp hóa trị liệu thường dựa trên việc phát hiện sự khác biệt giữa tế bào tăng sinh đích và các tế bào bình thường khác trong cơ thể người và động vật. Ví dụ, nhiều hóa chất được thiết kế để được hấp thụ bằng cách tái bản ADN một cách nhanh chóng sao cho quá trình sao chép ADN và phân chia tế bào bị phá vỡ. Một cách khác đó là xác định các kháng nguyên trên bề mặt tế bào u hoặc các tế bào bất thường khác mà không được biểu hiện bình thường trong mô trưởng thành của người, như các kháng nguyên u hoặc các kháng nguyên phôi. Các kháng nguyên này có thể là đích của các protein liên kết như các kháng thể mà có thể phong bế hoặc trung hòa kháng nguyên này. Ngoài ra, các protein liên kết, bao gồm kháng thể và các mảnh của nó, có thể phân phối chất gây độc hoặc hợp chất khác có khả năng hoạt hóa chất gây độc một cách trực tiếp hoặc gián tiếp tại vị trí u.

EGFR là một đích hấp dẫn đối với liệu pháp kháng thể nhằm vào khối u do nó được biểu hiện quá mức ở nhiều loại khối u biểu mô (Voldborg et al. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol. 8, 1197-206; den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor

Antigens. In: P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology, Second Edition, pp. 2424-31. London: Academic Press (1998)). Ngoài ra, sự biểu hiện EGFR thường đi kèm với tiên lượng bệnh kém ở một số loại u, bao gồm khối u dạ dày, ruột, bàng quang niệu đạo, vú, tuyến tiền liệt, màng trong tử cung, thận và não (ví dụ, khối u thần kinh đệm). Do đó, trong tài liệu chuyên ngành, một số kháng thể EGFR được thông báo là đang được đánh giá lâm sàng (Baselga et al. (2000) Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin. J. Clin. Oncol. 18, 904; Faillot et al. (1996): A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monantibody for the treatment malignant gliomas. Neurosurgery. 39, 478-83; Seymour, L. (1999) Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. Cancer Treat. Rev. 25, 301-12)).

Các kết quả thu được từ nhiều nghiên cứu sử dụng các mảnh kháng thể của EGFR (EGFR mAb) ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư cổ và đầu, ung thư phổi tế bào nhỏ, khối u thần kinh đệm não và tế bào hình sao ác tính là đáng khích lệ. Hoạt tính kháng khối u của hầu hết các kháng thể EGFR được tăng cường bởi khả năng phong bế sự liên kết với phối tử của chúng (Sturgis et al. (1994), Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. Otolaryngol. Head Neck. Surg. 111, 633-43; Goldstein et al. (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin. Cancer Res. 1, 1311-8). Các kháng thể này đều có thể điều chỉnh được hoạt lực của chúng thông qua cả việc điều hòa quá trình tăng sinh tế bào lẫn các chức năng miễn dịch phụ thuộc kháng thể (ví dụ, hoạt hóa bổ thể). Tuy nhiên, việc sử dụng các kháng thể này có thể bị hạn chế do sự hấp thu ở các cơ quan có EGFR nội sinh cao như gan và da (Baselga et al., 2000; Faillot et al., 1996).

Có một tỷ lệ đáng kể các khối u chứa các dạng khuếch đại của gen EGFR (nghĩa là, nhiều bản sao của gen EGFR) mà cũng đồng biểu hiện các dạng bị cắt cụt của thụ thể này (Wikstrand et al. (1998), The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol. 4, 148-158) đã biết, đó là de2-7 EGFR, ΔEGFR, hoặc Δ2-7 (theo sáng chế, các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau) (Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human

prostate cancer. Br. J. Cancer. 82, 186-94). Đã phát hiện thấy rằng sự sắp xếp lại trong de2-7 EGFR giúp tạo ra ARN thông tin trưởng thành thiếu 801 nucleotit, kể cả các exon 2-7 trong khung (Wong et al. (1992), Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 89, 2965-9; Yamazaki et al. (1990), A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. Jpn. J. Cancer Res. 81, 773-9; Yamazaki et al. (1988), Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. Mol. Cell Biol. 8, 1816-20; Sugawa et al. (1990), Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8602-6). Protein EGFR tương ứng mà đã loại bỏ 267 axit amin bao gồm các gốc từ 6 đến 273 thuộc vùng ngoại bào và các gốc glyxin mới ở vị trí tiếp hợp (Sugawa et al., 1990). Việc loại bỏ nêu trên cùng với chèn thêm gốc glyxin đã tạo ra một peptit nối đặc trưng tại vị trí đó (Sugawa et al., 1990).

Hợp chất de2-7 EGFR đã được phát hiện ra ở một số loại khối u bao gồm khối u thần kinh đệm, vú, phổi, buồng trứng và tuyến tiền liệt (Wikstrand et al. (1997), Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. Cancer Res. 57, 4130-40; Olapade-Olaopa et al. (2000), Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer. 82, 186-94; Wikstrand, et al. (1995), Monoclonal antibodies against EGFRvIII in are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res. 55, 3140-8; Garcia de Palazzo et al. (1993), Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. 53, 3217-20). Mặc dù thụ thể bị cắt này không liên kết với phối tử, nhưng nó có hoạt tính cơ định thấp và trợ giúp cho các tế bào khối u thần kinh đệm phát triển dưới dạng các mảnh ghép khối u khác loại ở chuột trụi lông (Nishikawa et al. (1994), A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced sinh uity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-31) và có khả năng biến nạp vào các tế bào NIH3T3 (Batra et al. (1995), Epidermal growth factor ligand independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ. 6, 1251-9) và các tế bào

MCF-7. Cơ chế tế bào đối với de2-7 EGFR trong các tế bào khối u thần kinh đệm hiện nay vẫn chưa được xác định rõ, nhưng đã được thông báo là bao gồm sự suy giảm quá trình chết tế bào theo chương trình, (Nagane et al. (1996), A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced sinh uity on human glioblastomcells by increasing proliferation and reducing apoptosis. Cancer Res. 56, 5079-86) và làm tăng nhẹ quá trình tăng sinh tế bào (Nagane et al., 1996).

Do sự biểu hiện thụ thể bị cắt này bị giới hạn ở các tế bào khối u nên nó là đích đặc hiệu cao đối với liệu pháp kháng thể. Do đó, một số phòng thí nghiệm đã tạo ra cả kháng thể đa dòng (Humphrey et al. (1990), Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 4207-11) lẫn kháng thể đơn dòng (Wikstrand et al. (1995) Monoantibody against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas; Okamoto et al. (1996), Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. Br. J. Cancer. 73, 1366-72; Hills et al. (1995), Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537-43) mà đặc hiệu với peptit đặc trưng của de2-7 EGFR. Một loạt mAb của chuột nhắt, được phân lập sau khi gây miễn dịch bằng peptit đặc trưng của de2-7 EGFR đều thể hiện tính chọn lọc và đặc hiệu đối với thụ thể bị cắt này và có đích là các mảnh ghép khác loài dương tính với de2-7 EGFR phát triển ở chuột trụi lông (Wikstrand et al. (1995); Reist et al. (1997), Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 57, 1510-5; Reist et al. (1995), Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. Cancer Res. 55, 4375-82).

Tuy nhiên, một nhược điểm tiềm ẩn của kháng thể de2-7 EGFR đó là chỉ có một tỷ lệ khối u nhất định có sự khuếch đại của gen EGFR cũng biểu hiện de2-7EGFR (Ekstrand et al. (1992), Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N-and/or C-terminal tails. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 89, 4309-13). Tỷ lệ phần trăm

cụ thể về số u biểu hiện de2-7 EGFR vẫn chưa xác định được rõ ràng, do việc sử dụng các kỹ thuật khác nhau (nghĩa là, PCR dựa trên hóa mô miễn dịch) và các kháng thể khác nhau nên đã thu được các giá trị với sai số lớn về tần số xuất hiện của nó. Các số liệu đã công bố cho thấy có khoảng 25-30% khối u thần kinh đệm biểu hiện de2-7 EGFR với mức biểu hiện thấp nhất ở khối u sao bào mất biệt hóa và cao nhất ở khối u não (Wong et al. (1992); Wikstrand et al. (1998), The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol. 4, 148-58; Moscatello et al. (1995), Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors . Cancer Res. 55, 5536-9). Tỷ lệ tế bào dương tính trong các tế bao khối u thần kinh đệm biểu hiện de2-7 EGFR được thông báo là vào khoảng 37-86% (Wikstrand et al. (1997)). Đã phát hiện rằng tỷ lệ dương tính đối với d2-7 EGFR là 27% trong ung thư biểu mô vú và 17% trong ung thư phổi (Wikstrand et al. (1997); Wikstrand et al. (1995); Wikstrand et al.(1998); và Hills et al., 1995). Do đó, các kháng thể đặc hiệu với de2-7 EGFR được cho là chỉ hữu dụng trong tỷ lệ % khối u dương tính với EGFR.

Do đó, trong khi bằng chứng hiện có cho thấy khả năng của kháng thể EGFR đã và đang được phát hiện thì những hạn chế nhận thấy được về khả năng và hiệu lực của kháng thể này vẫn chưa được khắc phục. Do đó, cần phát triển các kháng thể và các chất tương tự kháng thể có hoạt lực đối với rất nhiều loại khối u và từ đó giải quyết được vấn đề kỹ thuật nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Dựa trên phần mô tả, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu mô (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR), trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 164 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 166.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất kit chứa kháng thể phân lập được theo sáng chế dùng để chẩn đoán khối u, trong đó EGFR được biểu hiện bất thường hoặc EGFR được biểu hiện ở dạng protein bị cắt cụt.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể phân lập được theo sáng chế dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vật chủ đơn bào được biến nạp với phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch chứa chất gây độc tế bào và kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Sáng chế và các phương án thực hiện được thể hiện trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Sáng chế đề xuất các phần tử liên kết đặc hiệu phân lập được, cụ thể là các kháng thể hoặc mảnh của chúng, nhận biết epitop EGFR không có các thay thế hoặc cải biến so với EGFR kiểu dại và được phát hiện thấy trong các tế bào sinh u, siêu tăng sinh hoặc bất thường và thường không phát hiện được trong các tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại (thuật ngữ "tế bào kiểu dại" theo sáng chế bao gồm tế bào biểu hiện EGFR nội sinh, nhưng không biểu hiệu de 2-7EGFR và thuật ngữ này rõ ràng là không bao gồm tế bào biểu hiện quá mức gen EGFR; thuật ngữ "kiểu dại" chỉ kiểu gen hoặc kiểu hình hoặc dạng đặc trưng khác có trong tế bào bình thường nhưng không có trong tế bào bất thường hoặc tế bào sinh u). Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh của chúng, mà nhận biết epitop EGFR phát hiện được trong các tế bào sinh u, siêu tăng sinh hoặc bất thường và thường không thể phát hiện được trong các tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại, trong đó epitop này được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến sau dịch mã một cách khác thường hoặc biểu hiện khác thường. Trong một ví dụ cụ thể, nhưng không chỉ giới hạn ở phạm vi được nêu ở đây, epitop EGFR được tăng cường hoặc được cải thiện, trong đó cải biến sau dịch mã là chưa hoàn chỉnh hoặc đầy đủ đến mức thấy được như mức biểu hiện bình thường của EGFR trong các tế bào kiểu dại. Theo một phương án, epitop EGFR được tăng cường hoặc được cải thiện tùy vào việc cải biến hydratcacbon ban đầu hoặc cải biến đơn giản hoặc glycosyl hóa sớm, cụ thể là cải biến manoza ở mức lớn, và bị giảm hoặc thể hiện không rõ ràng khi có mặt của việc cải biến carbohydrat phức.

Các phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh của chúng, như các mảnh sinh miễn dịch của chúng, gần như không liên kết đặc hiệu hoặc nhận

biết các tế bào bình thường hoặc các tế bào kiểu dại chứa epitop EGFR bình thường hoặc kiểu dại khi xuất hiện mức biểu hiện bất thường và khi có mặt cải biến sau dịch mã EGFR bình thường.

Cụ thể, phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh của chúng, nhận biết epitop EGFR có mặt trong các tế bào biểu hiện quá mức EGFR (ví dụ, gen EGFR được khuếch đại) hoặc biểu hiện de2-7 EGFR, cụ thể là khi có mặt cải biến sau dịch mã một cách bất thường, và thường không thể phát hiện được trong các tế bào biểu hiện EGFR trong các điều kiện bình thường, cụ thể là khi có mặt cải biến sau dịch mã bình thường.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra các kháng thể đơn dòng, được lấy làm ví dụ theo sáng chế bởi các kháng thể được ký hiệu là mAb806, ch806, hu806, mAb175, mAb124 và mAb1133, mà nhận biết đặc hiệu EGFR được biểu hiện bất thường. Cụ thể, các kháng thể theo sáng chế nhận biết epitop EGFR được phát hiện trong các tế bào sinh u, siêu tăng sinh hoặc bất thường và thường không thể phát hiện được trong các tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại, trong đó epitop này được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường. Các kháng thể theo sáng chế cũng nhận biết EGFR kiểu dại được khuếch đại và de2-7 EGFR, nhưng liên kết đặc hiệu với epitop khác với peptit tiếp hợp đồng nhất của thể đột biến de2-EGFR. Các kháng thể theo sáng chế nhận biết đặc hiệu EGFR biểu hiện bất thường, bao gồm EGFR được khuếch đại và thể đột biến EGFR (được lấy làm ví dụ theo sáng chế là đột biến de2-7), cụ thể là khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường. Ngoài ra, các kháng thể này không nhận biết EGFR được biểu hiện trên bề mặt tế bào của dòng tế bào khối u thần kinh đệm biểu hiện EGFR với lượng bình thường đồng thời chúng cũng liên kết đặc hiệu với vùng ngoại bào của EGFR (EGFR tan) được cố định trên bề mặt đĩa ELISA, điều này cho thấy chúng nhận biết epitop cấu hình. Các kháng thể này liên kết đặc hiệu với bề mặt của các tế bào A431, có khả năng khuếch đại gen EGFR, nhưng không biểu hiện de2-7 EGFR. Quan trọng là, các kháng thể này liên kết không đáng kể với các mô bình thường như gan và da, biểu hiện EGFR nội sinh, kiểu dại với mức cao hơn so với hầu hết các mô bình thường khác, trong đó EGFR không được biểu hiện bất thường hoặc được khuếch đại.

Các kháng thể theo sáng chế phân biệt rõ ràng về bản chất của khối u biểu hiện EGFR hoặc các tế bào sinh u, bằng cách nhuộm màu hoặc nếu không thì nhận biết

được các khối u hoặc các tế bào biểu hiệu EGFR bất thường, bao gồm sự khuếch đại EGFR và/hoặc đột biến EGFR, cụ thể là sự có mặt của de2-7EGFR. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế biểu hiện hoạt tính kháng u *in vivo* đáng kể trên các khối u mang EGFR được khuếch đại và trên các mảnh ghép khác loài dương tính với de2-7 EGFR.

Tính đặc hiệu đặc trưng của các kháng thể này là liên kết đặc hiệu với de2-7 EGFR và EGFR được khuếch đại, nhưng không liên kết với EGFR bình thường, kiểu dại, nhờ đó chúng được sử dụng để chẩn đoán và điều trị nhằm xác định, phân tích đặc trưng và nhằm vào một số loại u, ví dụ khối u đầu và cổ, vú, hoặc tuyến tiền liệt và khối u thần kinh đệm, mà không ảnh hưởng đến sự hấp thu của mô bình thường có thể thấy ở kháng thể EGFR đã biết trước đây.

Do đó, sáng chế đề xuất protein liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể, liên kết đặc hiệu với de2-7 EGFR tại epitop khác với peptit nối, nhưng gần như không liên kết đặc hiệu với EGFR trên các tế bào bình thường khi có mặt sự khuếch đại gen EGFR. Thuật ngữ "sự khuếch đại" bao gồm cả tế bào chứa nhiều bản sao của gen EGFR.

Tốt hơn, nếu epitop được nhận biết bởi các kháng thể theo sáng chế nằm trong vùng chứa các gốc 273-501 của trình tự EGFR trưởng thành bình thường hoặc kiểu dại, và tốt hơn, nếu chứa các gốc 287-302 (SEQ ID NO:14) của trình tự EGFR trưởng thành bình thường hoặc kiểu dại. Do đó, sáng chế cũng đề xuất các protein liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể, liên kết đặc hiệu với d2-7 EGFR tại epitop nằm trong vùng bao gồm các gốc 273-501 và/hoặc 287-302 (SEQ ID NO:14) của trình tự EGFR. Epitop này có thể được xác định bằng các kỹ thuật lập bản đồ epitop thông thường bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo cách khác, trình tự ADN mã hóa các gốc 273-501 và/hoặc 287-302 (SEQ ID NO:14) có thể được phân cắt, và các mảnh thu được này được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Liên kết kháng thể có thể được xác định như trên.

Các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể có các đặc trưng của kháng thể mà được các tác giả sáng chế phát hiện và xác định đặc tính, cụ thể là nhận biết EGFR được biểu hiện bất thường, như được phát hiện ở EGFR được khuếch đại và de2-7EGFR.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất các kháng thể có khả năng cạnh tranh với kháng thể theo sáng chế, trong điều kiện mà có ít nhất 10% kháng thể có trình tự chuỗi VH và VL của kháng thể theo sáng chế bị phong bế liên kết với de2-7EGFR bằng cách cạnh tranh với kháng thể này trong thử nghiệm ELISA. Cụ thể, sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể kháng genotyp. Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng genotyp LMH-11, LMH-12 và LMH-13.

Sự liên kết của kháng thể với kháng nguyên đích của nó được điều chỉnh thông qua các vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR) của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, với vai trò của CDR3 là đặc biệt quan trọng. Do đó, các phần tử liên kết đặc hiệu dựa trên các vùng CDR3 của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và tốt hơn, nếu cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế sẽ là các phần tử liên kết đặc hiệu hữu dụng đối với liệu pháp *in vivo*.

Do đó, các protein liên kết đặc hiệu như các kháng thể dựa trên các CDR của các kháng thể theo sáng chế được xác định, cụ thể là các vùng CDR3, sẽ hữu dụng để hướng đích cho khối u có EGFR được khuếch đại kể cả trạng thái de2-7 EGFR của nó. Do các kháng thể theo sáng chế liên kết không đáng kể với thụ thể bình thường, kiểu dại nên sẽ không bị hấp thu nhiều ở mô bình thường, đây là hạn chế của kháng thể EGFR hiện đang được phát triển.

Sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được có khả năng liên kết với EGFR trên các khối u chứa các phiên bản khuếch đại của gen EGFR, trong đó các tế bào khối u chứa nhiều bản sao của gen EGFR, và trên các khối u biểu hiện phiên bản bị cắt của thụ thể EGFR, EGFRde2-7, trong đó kháng thể này không liên kết với peptit nối của d2-7 EGFR chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:13, trong đó kháng thể này liên kết với epitop nằm trong trình tự mang các gốc 287-302 (SEQ ID NO:14) của EGFR kiểu dại ở người, và trong đó, kháng thể này không chứa trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và không chứa trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47.

Sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các vùng liên kết polypeptit có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44, 45 và 46.

Sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa các vùng liên kết polypeptit có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49, 50 và 51.

Theo một phương án, kháng thể phân lập được có dạng kháng thể F(ab')2, mảnh scFv, mảnh diabody, triabody hoặc tetrabody.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được còn chứa chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc chất đánh dấu chức năng.

Theo một phương án, chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc chất đánh dấu chức năng là dược chất được gắn với kháng thể bằng liên kết đồng hóa trị.

Theo một phương án, chất đánh dấu là chất đánh dấu phóng xạ.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được, trong đó kháng thể phân lập được này được pegyl hóa.

Theo một trường hợp, sáng chế đề xuất axit nucleic phân lập được chứa trình tự mã hóa kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể phân lập được, phương pháp này bao gồm bước biểu hiện axit nucleic được nêu ở trên và dưới đây trong các điều kiện dẫn đến sự biểu hiện kháng thể này, và bước thu hồi kháng thể này.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị khối u ở bệnh nhân, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân dùng một lượng hữu hiệu kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất kit dùng để chẩn đoán u, trong đó EGFR được biểu hiện bất thường hoặc trong đó EGFR được biểu hiện ở dạng protein bị cắt, chứa kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Theo một phương án, kit này còn chứa thuốc thử và/hoặc hướng dẫn sử dụng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể phân lập được như được nêu ở đây.

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

Theo một phương án, dược phẩm này còn chứa chất chống ung thư được chọn từ nhóm bao gồm các hóa chất trị liệu, kháng thể kháng EGFR, chất phóng xạ miễn dịch trị liệu và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, các hóa chất trị liệu được chọn từ nhóm bao gồm các chất ức chế enzym tyrosin kinaza, các chất ức chế chu trình phosphoryl, các chất điều hòa sau dịch mã, các chất ức chế sự phát triển hoặc phân chia tế bào (ví dụ, các chất chống gián phân), các chất ức chế dẫn truyền tín hiệu và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, các chất ức chế enzym tyrosin kinaza được chọn từ nhóm bao gồm AG1478, ZD1839,STI571, OSI-774, SU-6668 và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng EGFR được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng EGFR 528,225, SC-03,DR8. 3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF và hỗn hợp của chúng.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú một lượng dược phẩm có hiệu quả điều trị theo sáng chế.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị khối u não do EGFR biểu hiện bất thường trong động vật có vú, phương pháp này bao gồm việc sử dụng do động vật có vú một lượng dược phẩm có hiệu quả điều trị theo sáng chế.

Theo một trường hợp khác, khối u trong não được chọn từ nhóm bao gồm khối u thần kinh đệm, khối u nguyên tủy bào, khối u màng não, khối u sao bào tân sinh và dị dạng tĩnh mạch tân sinh.

Sáng chế đề xuất vật chủ đơn bào được biến nạp bằng phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa kháng thể phân lập được theo sáng chế.

Theo một phương án, vật chủ đơn bào được chọn từ nhóm bao gồm *E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces*, nấm men, các tế bào CHO, YB/20, NSO,SP2/0,

Rl.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 và BMT10, các tế bào thực vật, các tế bào côn trùng, và các tế bào của người trong môi trường nuôi cấy mô.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện có sự khuếch đại EGFR, de2-7EGFR hoặc EGFR với mức glycosyl hóa cao ở manoza, trong đó EGFR được xác định bằng cách: (a) cho mẫu sinh học thu được từ động vật có vú mà có sự khuếch đại EGFR, de2-7EGFR hoặc EGFR có mức glycosyl hóa cao ở manoza tiếp xúc với kháng thể phân lập được theo điểm 1 trong điều kiện cho phép EGFR liên kết với kháng thể phân lập; và (b) phát hiện xem có hay không có sự liên kết giữa EGFR trong mẫu với kháng thể phân lập được; ở đây nếu phát hiện ra sự liên kết thì chứng tỏ là có mặt hoặc hoạt tính của EGFR trong mẫu.

Theo một trường hợp khác của phương pháp phát hiện sự có mặt của hiện tượng khuếch đại EGFR, de2-7EGFR hoặc EGFR có mức glycosyl hóa cao ở manoza, nếu phát hiện thấy có mặt của EGFR thì chứng tỏ có sự tồn tại của u hoặc ung thư ở động vật có vú.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được có khả năng liên kết với EGFR trên các khối u chứa các dạng khuếch đại của gen EGFR, trong đó các tế bào khối u chứa nhiều bản sao của gen EGFR, và trên các khối u biểu hiện dạng bị cắt của thụ thể EGFR de2-7, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42, và chuỗi nhẹ của kháng thể này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được có khả năng liên kết với EGFR trên các khối u chứa các dạng khuếch đại của gen EGFR, trong đó các tế bào khối u chứa nhiều bản sao của gen EGFR, và trên các phiên bản bị cắt của thụ thể EGFR de2-7, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các vùng liên kết polypeptit có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44, 45 và 46, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa vùng liên kết với polypeptit có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49, 50 và 51.

Các mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này khi tham khảo phần mô tả chi tiết dưới đây. Phần mô tả này có viện dẫn đến các hình vẽ minh họa và các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là kết quả của phép phân tích do dòng tế bào của dòng tế bào u thần kinh đệm. Các tế bào U87MG (biểu đồ màu xám nhạt) và U87MG.Δ2-7 (biểu đồ màu xám đậm) được nhuộm màu bằng kháng thể IgG2b không liên quan (các biểu đồ màu trắng), DH8.3 (đặc hiệu đối với de2-7 EGFR), mAb806 hoặc 528 (cả hai kháng thể này đều liên kết với EGFR kiểu dại và de2-7 EGFR) như được thể hiện.

Fig.2A-Fig.2D thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA đối với mAb806, mAbDH8.3 và mAb528. (A) liên kết của mAb806 (▲) DH8.3 (•) hoặc kháng thể 528 (■) ở nồng độ gia tăng với các đĩa ELISA được phủ EGFR hòa tan (soluble EGFR – sEGFR). (B) mức độ ức chế khả năng liên kết của mAb806 và mAb528 với các đĩa ELISA được phủ sEGFR bằng sEGFR trong dung dịch với nồng độ gia tăng. (C) liên kết của DH8.3 ở nồng độ gia tăng với peptit nối của EGFR de2-7 minh họa đường cong liên kết của mAb806 và mAb528 đối với sEGFR kiểu dại được cố định (D).

Fig.2E và Fig.2F thể hiện trên đồ thị kết quả của nghiên cứu liên kết BIAcore bằng cách sử dụng peptit đầu C được biotin hóa và kháng thể đơn dòng theo sáng chế, cùng với các kháng thể đã biết khác, trong số đó, kháng thể L8A4 nhận biết peptit tiếp hợp của thể đột biến d2-7 EGFR, và kiểm soát peptit này.

Fig.3 minh họa việc thu nhận mAb806 và kháng thể DH8.3. Các tế bào U87MG.Δ2-7 được ủ trước với mAb806 (▲) hoặc DH8.3 (•) ở 4°C, sau đó nâng nhiệt độ lên 37°C và mức độ thu nhận được xác định bằng FACS. Số liệu này là mức độ thu nhận trung bình ở từng thời điểm ± SE đối với 3 thử nghiệm riêng biệt (đối với DH8.3) hoặc đối với 4 thử nghiệm riêng biệt (đối với mAb806).

Fig.4A và Fig.4B minh họa sự phân bố sinh học (% ID/g mô khối u) của kháng thể được đánh dấu phóng xạ (a) ^{125}I-mAb806 và (b) ^{131}I-DH8.3 ở chuột trụi lông mang khối u ghép khác loài U87MG và U87MG.Δ2-7. Số liệu tại mỗi điểm là giá trị trung bình thu được từ 5 con ± SE ngoại trừ thời điểm 1 giờ khi n = 4.

Fig.5A và Fig.5B minh họa sự phân bố sinh học của kháng thể được đánh dấu phóng xạ ^{125}I-mAb806 (cột trắng) và ^{131}I-DH8.3 (cột đen) được biểu hiện dưới dạng (a) tỷ lệ khối u:máu hoặc (b) khối u:gan ở chuột trụi lông mang khối u ghép khác loài U87MG.Δ2-7. Số liệu tại mỗi cột là giá trị trung bình thu được từ 5 con ± SE ngoại trừ thời điểm 1 giờ khi n = 4.

Fig.6A-Fig.6C minh họa phép phân tích theo dòng tế bào đối với các dòng tế bào có sự khuếch đại gen EGFR. Các tế bào A431 được nhuộm màu bằng mAb806, DH8.3 hoặc 528 (biểu đồ màu đen) so với kháng thể IgG2b không liên quan (biểu đồ màu trắng).

Fig.7A và Fig.7B minh họa sự phân bố sinh học (% ID/g mô khối u) của các kháng thể được đánh dấu phóng xạ (a) ^{125}I-mAb806 và (b) ^{131}I-528 ở chuột trụi lông mang khối u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và A431.

Fig.8A-Fig.8D minh họa sự phân bố sinh học của kháng thể được đánh dấu phóng xạ ^{125}I-mAb806 (cột trắng) và ^{131}I-528 (cột đen) và các kháng thể được biểu hiện dưới dạng (A, B) tỷ lệ khối u:máu hoặc (C, D) tỷ lệ khối u:gan ở chuột trụi lông mang (A, C) của khối u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và (B, D) khối u ghép khác loài A431.

Fig.9A và 9B minh họa tác động kháng khối u của mAb806 đến tốc độ phát triển của khối u ghép khác loài (A) U87MG và (B) U87MG.Δ2- 7 ở mẫu phòng ngừa. Tiêm 3×10^6 tế bào U87MG hoặc U87MG.Δ2-7 vào dưới da vào hai bền sườn của chuột trụi lông BALB/c từ 4-6 tuần tuổi, (n = 5) vào ngày thứ 0. Những con chuột này được tiêm trong màng bụng (i.p) bởi 1 mg mAb806 (•); 0,1 mg mAb806 (▲); hoặc tá dược (o) trước khi chủng tế bào khối u một ngày. Tiến hành tiêm ba lần một tuần trong hai tuần như được thể hiện bằng các mũi tên. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± độ lệch chuẩn.

Fig.10A, Fig.10B và Fig.10C minh họa tác dụng kháng khối u của mAb806 trên mảnh ghép khác loài (A) U87MG, (B) U87MG.Δ2-7 và (C) U87MG.wtEGFR trong mẫu khối u. Tiêm 3×10^6 tế bào U87MG, U87MG.Δ2-7 hoặc U87MG.wtEGFR vào dưới da và vào hai bên sườn của chuột nhắt trụi lông BALB/c từ 4-6 tuần tuổi, (n = 5). Chuột được tiêm trong màng bụng bởi liều dùng 1 mg mAb806 (•); liều dùng 0,1 mg

mAb806 (▲); hoặc tá dược (o) bắt đầu từ khi khối u đạt thể tích trung bình là từ 65 đến 80 mm^3. Tiến hành tiêm ba lần một tuần trong hai tuần như được thể hiện bằng các mũi tên. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± độ lệch chuẩn.

Fig.11A và Fig.11B minh họa tác dụng kháng u của mAb806 trên các mảnh ghép khác loài A431 trong (A) mẫu phòng ngừa và (B) mẫu khối u. Tiêm 3×10^6 tế bào A431 vào dưới da ở hai bên sườn của chuột nhắt trụi lông BALB/c từ 4-6 tuần tuổi, (n = 5). Chuột được tiêm trong màng bụng bởi liều dùng 1 mg của mAb806 (•); hoặc tá dược (o) bắt đầu từ khi khối u đạt thể tích trung bình là 200 mm^3. Tiến hành tiêm ba lần một tuần trong hai tuần như được thể hiện bằng các mũi tên. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± độ lệch chuẩn.

Fig.12 minh họa tác dụng kháng khối u của việc điều trị bằng mAb806 kết hợp với việc điều trị bằng AG1478 đối với mảnh ghép khác loài A431 trong mẫu phòng ngừa. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± độ lệch chuẩn.

Fig.13 mô tả khả năng liên kết của mAb806 với tế bào A431 khi có mặt AG1478 với nồng độ gia tăng (0,5μM và 5μM).

Fig.14A và Fig.14B minh họa (A) trình tự axit nucleic và (B) sự dịch mã axit amin của trình tự này của gen chuỗi VH của kháng thể 806 (SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2, tương ứng).

Fig.15A và Fig.15B minh họa (A) trình tự axit nucleic và (B) sự dịch mã axit amin của nó của nó của gen chuỗi VL của kháng thể 806 (SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4, tương ứng).

Fig.16 thể hiện trình tự của chuỗi VH (SEQ ID NO:2) được đánh số theo Kabat, với các CDR (SEQ ID NOS:15, 16 và 17) được gạch chân. Các gốc quan trọng trong trình tự của chuỗi VH (SEQ ID NO:2) là 24, 37, 48, 67 và 78.

Fig.17 thể hiện trình tự của chuỗi VH (SEQ ID NO:4) được đánh số theo Kabat, với các CDR (SEQ ID NO:18, 19 và 20) được gạch chân. Các gốc quan trọng trong trình tự của chuỗi VL (SEQ ID NO:4) là 36, 46, 57 và 71.

Fig.18A-Fig.18D thể hiện kết quả của nghiên cứu *in vivo* được thiết kế để xác định tác dụng điều trị của liệu pháp kháng thể phối hợp, cụ thể là mAb806 và kháng

thể 528. Chuột nhắt được chủng các tế bào U87MG.D2-7 (A và B),U87MG.DK (C), hoặc các tế bào A431 (D).

Fig.19A-Fig.19D thể hiện kết quả phân tích bằng kính hiển vi điện tử. Các tế bào U87MG.Δ2-7 được ủ trước với mAb806 hoặc DH8.3 sau đó IgG kháng chuột nhắt được dung hợp với vàng ở 4°C, nâng nhiệt độ đến 37°C và xác định mức độ kết hợp vào các thời điểm khác nhau bằng kính hiển vi điện tử. (A) cố định kháng thể DH8.3 vào giếng được phủ (mũi tên) sau 5 phút; (B) kết hợp mAb806 bằng cách đại ẩm bào (mũi tên) sau 2 phút; (C) cố định DH8.3 vào tiêu thể (mũi tên) sau 20 phút; (D) cố định mAb806 vào tiêu thể (mũi tên) sau 30 phút. Độ phóng đại cho tất cả các ảnh so với ban đầu là 30.000 lần.

Fig.20 thể hiện kết quả phép tự ghi hình phóng xạ đối với các phần ghép khác loài tế bào U87MG.Δ2-7 thu được sau khi tiêm ^{125}I-mAb806 8 giờ.

Fig.21 thể hiện kết quả phân tích của phép đo dòng tế bào đối với dòng tế bào chứa dạng khuếch đại của gen EGFR. Các tế bào HN5 và MDA-468 được nhuộm màu bằng kháng thể IgG2b không liên quan (biểu đồ trắng với đường nét đứt), mAb806 (biểu đồ đen) hoặc 528 (biểu đồ trắng với các đường nét liền). Kháng thể DH8.3 hoàn toàn âm tính với cả hai dòng tế bào (số liệu không được thể hiện).

Fig.22 thể hiện kết quả kết tủa miễn dịch của EGFR từ các dòng tế bào. EGFR được kết tủa miễn dịch từ các tế bào U87MG.Δ2-7 hoặc A431 được đánh dấu ^{35}S bởi mAb806, kháng thể sc-03 hoặc đối chứng IgG2b cùng lớp. Các mũi tên ở bên cạnh thể hiện vị trí của de2-7 và wt EGFR. Các mẫu giống nhau thu được từ ba thử nghiệm độc lập.

Fig.23 thể hiện tự ghi hình phóng xạ phần ghép khác loài tế bào A431 thu được sau 24 giờ kể từ khi tiêm ^{125}I-mAb806, các khu vực có mô nhìn thấy được thể hiện (các mũi tên).

Fig.24A và Fig.24B thể hiện khả năng sống sót được kéo dài của chuột nhắt trụi lông mang mảnh ghép khác loài U87MG.ΔEGFR (A) và LN-Z308.ΔEGFR (B) khi được điều trị bằng mAb806 toàn thân. Các tế bào U87MG.EGFR (1×10^5) hoặc các tế bào LN-Z308.ΔEGFR (5×10^5) được cấy vào trong não của chuột trụi lông, và chúng được xử lý bằng mAb806, PBS, hoặc isotyp IgG sau khi cấy ghép từ 0 đến 14 ngày.

Fig.24C và Fig.24D thể hiện mức độ ức chế sự phát triển của khối u trong não khi điều trị bằng mAb806. Chuột nhắt trụi lông (5 con/nhóm), được điều trị bằng mAb806 hoặc đối chứng IgG cùng lớp, bị giết vào ngày thứ 9 đối với U87MG.EGFR (C) và vào ngày thứ 15 đối với LN-Z308.ΔEGFR (D), và não chúng được lấy ra, cố định và cắt lát. Số liệu được tính toán bằng cách lấy thể tích khối u của đối chứng là 100%. Các giá trị là trung bình ± độ lệch chuẩn. ***, $P < 0,001$; đối chứng so với mAb806. Các đầu mũi tên, là các mô của khối u.

Fig.24E thể hiện tỷ lệ phần trăm chuột nhắt trụi lông mang mảnh ghép khác loài U87MG.ΔEGFR trong não có thời gian sống sót được kéo dài khi được điều trị bằng mAb806 trong khối u. Các tế bào U87MG.ΔEGFR được cấy ghép như đã mô tả. Tiêm 10mg mAb806 hoặc đối chứng IgG cùng lớp với thể tích 5µl vào vị trí khối u hàng ngày bắt đầu từ ngày thứ nhất 1 ngày trong 5 lần.

Fig.25A, Fig.25B và Fig.25C thể hiện mAb806 có tác dụng kéo dài thời gian sống sót của chuột nhắt mang u não U87MG.wtEGFR nhưng không mang u U87MG.DK hoặc U87MG. Các tế bào U87MG (A), U87MG.DK (B) hoặc U87MG.wtEGFR (C) (5×10^5) được cấy ghép vào não của chuột nhắt trụi lông, và chúng được điều trị bằng mAb806 sau khi cấy từ sau khi cấy ghép từ 0 đến 14 ngày, và theo dõi sau khi ngừng điều trị.

Fig.26A thể hiện kết quả của phép phân tích FACS đối với hoạt tính của mAb806 với các dòng tế bào U87MG. U87MG, U87MG.ΔEGFR, U87MG.DK và các tế bào U87MG.wtEGFR được nhuộm màu bằng kháng thể kháng EGFR, mAb528, EGFR.1 và kháng thể kháng ΔEGFR, mAb806. Kháng thể EGFR.1 đơn dòng chỉ nhận biết wtEGFR nhưng kháng thể 528 đơn dòng phản ứng với cả wtEGFR lẫn ΔEGFR. mAb806 phản ứng mạnh với U87MG.ΔEGFR và U87MG.DK nhưng phản ứng yếu với U87MG.wtEGFR. Các cột trên hoành độ, mức nhuộm màu tối đa của các tế bào khi có mặt kháng thể thứ nhất. Kết quả thu được này là ổn định trong ba thử nghiệm độc lập.

Fig.26B thể hiện kết quả kết tủa miễn dịch dạng EGFR bằng mAb806. EGFR đột biến và wtEGFR được phân lập miễn dịch bằng kháng thể kháng EGFR, mAb528, EGFR. 1, hoặc kháng thể kháng ΔEGFR kháng thể, mAb806, từ các tế bào (hàng 1) U87MG, (hàng 2) U87Δ.EGFR, (hàng 3) U87MG.DK, và (hàng 4) U87MG.wtEGFR,

và sau đó được phát hiện bằng phương pháp thẩm tách Western bằng kháng thể kháng pan-EGFR, C13.

Fig.27A và Fig.27B thể hiện tác dụng của việc điều trị toàn thân bằng mAb806 trong việc làm giảm sự phosphoryl hóa của ΔEGFR và Bel-XL biểu hiện trong các khối u não U87MG.ΔEGFR. Các khối u U87MG.ΔEGFR được cắt vào ngày thứ 9 trong quá trình điều trị bằng mAb806, xử lý, đông lạnh ngay trong nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C trước khi chuẩn bị dịch làm tan khối u.

(A) phương pháp phân tích thẩm tách Western đối với mức biểu hiện và mức tự phosphoryl hóa ΔEGFR. Nạp 30μg dịch tan của khối u lên gel SDS-polyacrylamit, chuyển lên màng nitroxenluloza, và được dò bằng kháng thể kháng phosphotyrosin, sau đó được lấy ra và dò lại bằng kháng thể kháng EGFR, C13.

(B) Thẩm tách Western Bcl-XL bằng cách sử dụng cùng dịch tan khối u như đã nêu ở (A). Các màng được dò bằng kháng thể đa dòng kháng Ccl-X của người. Làn 1 và 2, u não U87MG.ΔEGFR được điều trị bằng đối chứng cùng lớp; Làn 3 và 4, u não U87MG.ΔEGFR được điều trị bằng mAb806.

Fig.28 thể hiện việc điều trị bằng mAb806 sẽ làm giảm sự phát triển và tạo mạch máu mới và làm tăng quá trình chết theo chương trình của tế bào và tích lũy đại thực bào trong các khối u U87MG.ΔEGFR. Các lát cắt u được nhuộm màu bằng Ki-67. Chỉ số tăng sinh tế bào được đánh giá bằng tỷ lệ % tổng số tế bào dương tính với Ki-67 từ bốn trường năng lượng cao được chọn ngẫu nhiên (X400) trong các khối u trong não từ bốn con chuột nhắt trong mỗi nhóm. Số liệu là giá trị trung bình + độ lệch chuẩn. Các tế bào chết theo chương trình được phát hiện bằng thử nghiệm TUNEL. Chỉ số tế bào chết theo chương trình được đánh giá bằng tỷ lệ tế bào dương tính trong thử nghiệm TUNEL:tổng số tế bào từ bốn trường năng lượng cao được chọn ngẫu nhiên (X400). Số liệu là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các lát cắt u được nhuộm màu miễn dịch bằng kháng thể kháng CD31. Các MVA được phân tích bằng phép phân tích ảnh trên máy tính từ bốn trường được chọn ngẫu nhiên (X200) từ các khối u trong não từ bốn con trong mỗi nhóm. Vùng xung quanh khối thấm lọc đại thực bào khối u U87MG.ΔEGFR được xử lý bằng mAb806. Các lát cắt u được nhuộm màu bằng kháng thể kháng F4/80.

Fig.29 thể hiện kết quả phân tích đo dòng tế bào của dòng tế bào khối u thần kinh đệm gốc và được chuyển nhiễm U87MG. Các tế bào được nhuộm màu bằng kháng thể IgG2b không liên quan (các biểu đồ trắng) hoặc kháng thể 528 hoặc mAb806 (các biểu đồ đen) như được thể hiện.

Fig.30 thể hiện kết tủa miễn dịch của EGFR từ các dòng tế bào. EGFR được kết tủa miễn dịch từ các tế bào U87MG.wtEGFR, U87MG.Δ2-7, và A431 được đánh dấu ^{35}S bằng mAb806 (806), kháng thể sc-03 (c-term), hoặc đối chứng IgG2b cùng lớp (đối chứng). Các mũi tên chỉ vị trí của de2-7 và wt EGFR.

Fig.31 thể hiện các lát cắt parafin đại diện được nhuộm màu H&E từ mảnh ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR. Mảnh ghép khác loài U87MG.Δ2-7 (được thu gom 24 ngày sau khi chủng u) và U87MG.wtEGFR (được thu gom 42 ngày sau khi chủng u) được lấy từ chuột được điều trị như đã mô tả trên Fig.10, nêu trên, và nhuộm bằng H&E. Mảnh ghép khác loài U87MG.Δ2-7 (được thu gom 18 ngày sau khi chủng u) và U87MG.wtEGFR (được thu gom 37 ngày sau khi chủng u) cho thấy có rất ít khu vực bị hoại tử (bảng bên trái), trong khi đó quan sát thấy có mức độ hoại tử mạnh (các mũi tên) ở cả mảnh ghép khác loài U87MG.Δ2-7 lẫn U87MG.wtEGFR được điều trị bằng mAb806 (bảng bên phải).

Fig.32 thể hiện kết quả phân tích hóa mô miễn dịch mức độ biểu hiện EGFR ở các lát cắt đông lạnh thu được từ các mảnh ghép khác loài U87MG, U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR. Các lát cắt được thu gom tại các thời điểm như được mô tả trên Fig.31 nêu trên. Các phần ghép khác loài được nhuộm màu miễn dịch bằng kháng thể 528 (bảng bên trái) và mAb806 (bảng bên phải). Không thấy có hoạt tính miễn dịch giảm đối với wtEGFR, dạng khuếch đại của EGFR, hoặc de2-7 EGFR ở mảnh ghép khác loài được điều trị bằng mAb806. Phù hợp với số liệu *in vitro*, các mảnh ghép khác loài U87MG gốc dương tính với kháng thể 528, nhưng cho kết quả âm tính khi nhuộm màu bằng kháng thể mAb806.

Fig.33 thể hiện cấu trúc biểu hiện hai cistron đại diện được tạo ra theo sơ đồ. Quá trình phiên mã các chuỗi của kháng thể khảm được bắt đầu bằng trình tự khởi đầu Elongation Factor-1 và kết thúc bằng trình tự kết thúc nhân tạo mạnh. Các trình tự IRES được đưa vào giữa các vùng mã hóa của chuỗi nhẹ và và NeoR và chuỗi nặng và gen dhfr.

Fig.34A và Fig.34B thể hiện kết quả phân tích sự phân bố sinh học của ch806 được đánh dấu phóng xạ bằng (A) ^{125}I hoặc (B) ^{111}In được thực hiện trên chuột nhắt trụi lông BALB/c mang u ghép khác loài U87MG-de2-7. Các con chuột này được tiêm 5μg kháng thể đã đánh dấu phóng xạ và mỗi nhóm có bốn con bị giết ở các thời điểm khác nhau 8, 28, 48 hoặc 74 giờ. Các cơ quan được thu gom, cân và xác định hoạt tính phóng xạ trong máy đếm tia gama.

Fig.35A và Fig.35B mô tả (A) tỷ lệ % ID g mô của khối u và (B) tỷ lệ khối u theo lượng máu. Kháng thể được đánh dấu ^{111}In cho kết quả 30% ID/gam mô và tỷ lệ khối u/máu là 4,0.

Fig.36 thể hiện hiệu lực điều trị của kháng thể khảm ch806 trong mẫu khối u. Tiêm 3×10^6 tế bào U87MG.Δ2-7 trong 100 μl PBS vào dưới da ở hai bên sườn của chuột nhắt cái trụi lông từ 4 đến 6 tuần tuổi. mAb806 được sử dụng làm đối chứng dương. Việc điều trị được bắt đầu khi các khối u đạt đến thể tích trung bình là 50 mm^3 và bao gồm bước tiêm vào trong màng bụng 1mg ch806 hoặc mAb806 trong tổng số 5 lần tiêm vào các ngày đã chỉ định. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± độ lệch chuẩn đối với từng nhóm điều trị.

Fig.37 thể hiện hoạt tính CDC trên các tế bào đích (A) U87MG.de2-7 và tế bào đích (B) A431 đối với kháng thể khảm IgGI kháng EGFR, ch806 và đối chứng cG250. Kết quả được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ % tính gây độc tế bào trung bình (các cột; ± SD) trong ba lần xác định lặp lại.

Fig.38 thể hiện ADCC trên các tế bào đích (A) U87MG.de2-7 và (B) A431 theo tỷ lệ tế bào tác động:tế bào đích là 50:1 được điều biến thông qua ch806 và đối chứng cùng lớp cG250 (0-10 μg/ml). Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ % tính gây độc tế bào trung bình (các cột; ± SD) của ba lần xác định giống nhau.

Fig.39 thể hiện ADCC được điều chỉnh bởi 1 μg/ml mAb806 gốc và ch806 trên các tế bào đích U87MG.de2-7 theo khoảng tỷ lệ của tế bào tác động:tế bào đích. Kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ % tính gây độc tế bào trung bình (các cột; ± SD).

Fig.40 thể hiện 25 thể lai tạo ra các kháng thể liên kết với ch806, nhưng không liên kết với huIgG được chọn đầu tiên. Bốn trong số các tế bào lai kháng ch806 này có ái lực liên kết cao (các dòng 3E3, 5B8, 9D6 và 4D8) sau đó được tiếp tục nhân dòng từ

các tế bào đơn bằng cách pha loãng theo giới hạn và được ký hiệu là LMH (Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma: LMH) -11, -12, -13 và -14, tương ứng. Ngoài ra, hai tế bào lai tạo ra các mAb đặc hiệu với huIgG cũng được tách dòng và được tiếp tục phân tích đặc tính: các dòng 2C10 (LMH-15) và 2B8 (LMH-16).

Fig.41A, Fig.41B và Fig.41C cho thấy rằng sau khi nhân dòng, dịch nuôi cấy tế bào lai được xét nghiệm ba lần lặp lại bằng ELISA về khả năng trung hòa hoạt tính liên kết kháng nguyên của ch806 hoặc mAb806 với sEGFR621. Kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình (± SD) cho thấy hoạt tính đối kháng của kháng thể kháng genotyp, LMH -11, -12, -13 và -14 có khả năng phong bế liên kết của cả ch806 và mAb806 ở chuột nhắt với các đĩa được phủ sEGFR (LMH-14 không được thể hiện).

Fig.42A, Fig.42B và Fig.42C cho thấy các đĩa vi chuẩn độ được phủ bằng 10 µg/ml (A) LMH-11, (B) LMH -12 và (C) LMH-13 tinh sạch. Ba dòng đã tinh sạch này được so sánh về khả năng bắt giữ ch806 hoặc mAb806 trong huyết thanh hoặc 1% FCS/môi trường và sau đó, phát hiện ch806 hoặc mAb806 ở dạng liên kết. Các kháng thể cùng lớp dùng làm đối chứng hu3S193 và m3S193 trong huyết thanh và 1% FCS/môi trường có mặt ngoài các đối chứng cho thể dung hợp thứ hai avidin-HRP và cơ chất ABTS. Kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình (± SD) của ba mẫu giống nhau sử dụng LMH-12 được biotin hóa (10 µg/ml) để phát hiện và cho thấy LMH-12 được sử dụng để bắt giữ và phát hiện có độ nhạy cao nhất đối với ch806 trong huyết thanh (3 ng/ml) với khả năng liên kết với nền không đáng kể.

Fig.43 cho thấy hiệu lực của các điều kiện ELISA dược động tối ưu bằng cách sử dụng 1 µg/ml kháng thể kháng genotyp LMH-12 và 1 µg/ml LMH-12 được biotin hóa để bắt giữ và phát hiện, tương ứng. Ba thử nghiệm ELISA độc lập được tiến hành với bốn lần lặp lại để xác định ch806 trong huyết thanh của đối tượng cho (●) từ 3 đối tượng cho khỏe mạnh hoặc 1% BSA/môi trường (■) với đối chứng cùng lớp hu3S193 trong huyết thanh (▲) hoặc 1% BSA/môi trường (▼). Các đối chứng cho thể dung hợp thứ hai avidin-HRP (♦) và cơ chất ABTS (hexagon) riêng lẻ có mặt trong mỗi thử nghiệm ELISA. Kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình (± SD) cho thấy đường cong liên kết có độ ổn định cao để xác định ch806 (2 µg/ml – 1,6 ng/ml) trong huyết thanh với giới hạn phạt hiện 3 ng/ml. (n = 12; 1 – 100 ng/ml, hệ số biến đổi < 25%;

100 ng/ml – 5 µg/ml, hệ số biến đổi < 15%). Không phát hiện thấy liên kết với nền đối với mẫu huyết thanh bất kỳ được thử nghiệm và phát hiện thấy có liên kết không đáng kể với đối chứng cùng lớp hu3S193.

Fig.44 thể hiện kết quả của phân tích thẩm tách miễn dịch sEGFR tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào CHO, được thẩm tách bằng mAb806. sEGFR tái tổ hợp được xử lý bằng PNGaseF để loại bỏ sự glycosyl hóa được liên kết ở vị trí N (loại bỏ nhóm glucosyl), hoặc không xử lý (không xử lý), protein này được chạy trên SDS-PAGE, chuyển lên màng và được thẩm tách bằng mAb806.

Fig.45 mô tả kết quả kết tủa miễn dịch của EGFR từ các dòng tế bào được đánh dấu ^{35}S (U87MG.Δ2-7, U87MG-wtEGFR, và A431) với các kháng thể khác nhau (các kháng thể SC-03, 806 và 528).

Fig.46 mô tả kết quả kết tủa miễn dịch của EGFR từ các tế bào khác nhau (A431 và U87MG.Δ2-7) tại các thời điểm khác nhau (thời gian từ 0 đến 240 phút) sau khi đánh dấu xung bằng ^{35}S methionin/xystein. Các kháng thể 528 và 806 được sử dụng để kết tủa miễn dịch.

Fig.47 mô tả kết tủa miễn dịch của EGFR từ các dòng tế bào khác nhau (U87MGΔ2-7, U87MG-wtEGFR và A431) bằng các kháng thể khác nhau (SC-03, 806 và 528) khi có mặt (-) và sau khi phân cắt bằng Endo H (+) để loại bỏ các đường mà có hàm lượng manoza cao.

Fig.48 mô tả sự iot hóa bề mặt tế bào của dòng tế bào A431 và U87MG.Δ2-7 sau khi gây kết tủa miễn dịch bằng kháng thể 806, và có hoặc không được phân cắt bằng enzym Endo H, điều này khẳng định rằng EGFR liên kết với mAb806 trên bề mặt tế bào của các tế bào A431 là dạng nhạy với EndoH.

Fig.49 thể hiện vectơ pREN ch806 LC Neo (SEQ ID NO:7).

Fig.50 thể hiện vectơ pREN ch806 HC DHFR (SEQ ID NO:8).

Fig.51A-D thể hiện trình tự axit nucleic (SEQ ID NOS:21 và 26, tương ứng) và trình tự axit amin (SEQ ID NOS:22 và 27, tương ứng) của chuỗi VH và chuỗi VL của mAb124.

Fig.52A-D thể hiện trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:31 và 36, tương ứng) và trình tự axit amin (SEQ ID NOS:32 và 37, tương ứng) VH và chuỗi VL của mAb1133.

Fig.53 thể hiện đồ thị DNPlasmit của Lonzplasmit hai gen kết hợp bao gồm pEE12.4 chứa hộp biểu hiện hu806H (VH+CH), và pEE6.4 chứa hộp biểu hiện hu806L (VL+CL).

Fig.54 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO:41; SEQ ID NO:162 bổ trợ) của Lonzplasmit kết hợp như được mô tả trên Fig.53. Trình tự này cũng thể hiện các trình tự dịch mã (các SEQ ID NO:42-51 và 163-166) liên quan đến kháng thể hu806. Plasmit này được giải trình tự và kiểm tra trình tự mã hóa và dịch mã. Các phần nhỏ của trình tự này được tô đệm để xác định các vùng quan tâm; các vùng được tô đậm tương ứng với các vị trí tiếp hợp được nối ghép. Mã màu như sau:

(xám): vùng tín hiệu, các trình tự mã hóa ban đầu được phát hiện thấy ở cả vùng biến đổi của chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ;

(xanh nhạt hơi pha đỏ): chuỗi VH của hu806, vùng biến đổi của chuỗi nặng được ngụy trang;

(hồng): chuỗi CH của hu806, vùng ổn định của chuỗi nặng được tối ưu hóa codon;

(xanh lá): chuỗi VL của hu806, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được ngụy trang; và

(vàng): chuỗi CL của hu806, vùng ổn định của chuỗi nhẹ được tối ưu hóa codon.

Fig.55A và Fig.55B thể hiện các trình tự axit amin đã được dịch mã của hu806 (VH và chuỗi VL: SEQ ID NOS:164 và 166 và các peptit tín hiệu tương ứng: các SEQ ID NO:163 và 165; chuỗi CH và CL: các SEQ ID NO:43 và 48), và nêu số Kabat của chuỗi VH và VL (các SEQ ID NO:164 và 165, tương ứng), với các CDR (các SEQ ID NO:44-46 và 49-51) được gạch chân.

Fig.56A, Fig.56B, Fig.56C, Fig.57A, Fig.57B và Fig.57C cho thấy bước đầu tiên trong việc thiết kế ngụy trang, phân loại các gốc axit amin trong trình tự của mAb806 (chuỗi VH: SEQ ID NO:167 và chuỗi VL: SEQ ID NO:12) để lộ diện trên bề mặt. Phân loại được nêu bằng số có đánh dấu sao (*) nêu trên từng gốc, với các gốc lộ diện nhiều nhất có ba dấu sao. Các hình này bao gồm thiết kế thể hiện cách thức các oligonucleotit đầu tiên (chuỗi VH: Fig.56C và các SEQ ID NO:52 và 169-177; chuỗi VL: Fig.57C và các SEQ ID NO: 62, 66, 68 và 181-187) chồng lấn lên nhau để tạo ra

sản phẩm được ngụy trang sơ bộ (chuỗi VH: SEQ ID NO:168 và chuỗi VL: SEQ ID NO:180).

Fig.58 thể hiện bản đồ trình tự AND của chuỗi nặng của huIgG1 được tối ưu hóa codon (SEQ ID NO:80; SEQ ID NO:178 bổ trợ) và trình tự dịch mã axit amin của nó (SEQ ID NO:43).

Fig.59 thể hiện kết quả so sánh protein so với trình tự axit amin của VH + CH của hu806 (8C65AAG hu806 VH + CH; SEQ ID NO:81) với tệp tham chiếu ban đầu cho chuỗi VH của mAb806 (SEQ ID NO:167). Các vùng được đánh dấu thể hiện các trình tự axit amin được bảo toàn trong chuỗi VH. Các CDR được gạch chân. Các dấu sao phản ánh sự thay đổi đã được lập kế hoạch và tiến hành trong bước ngụy trang sơ bộ. Các vị trí được đánh số là các tham chiếu đến các cải biến sau đó.

Fig.60 thể hiện kết quả so sánh tương ứng đối với trình tự axit amin của VH + CH của hu806 (trình tự tín hiệu 8C65AAG của hu806+ VL + CL; SEQ ID NO:83) với tệp tham chiếu ban đầu cho chuỗi VL của mAb806 (SEQ ID NO:179). Nó chứa tệp bổ sung (trình tự tín hiệu r2vk1 của hu806 + VL + CL; SEQ ID NO:82), cấu trúc tiền chất, được bao gồm để minh họa sự thay đổi được tạo ra ở cải biến số 7.

Fig.61 thể hiện kết quả so sánh trình tự nucleotit và axit amin của trình tự tín hiệu của hu806 + các trình tự VL và CL (8C65AAG hu806 Vl+ Cl; các SEQ ID NO:190 và 188) với các trình tự của ch806 (pREN ch806 LC Neo; LICR; SEQ ID NO:189). Nó được cải biến và chú thích như được mô tả trên Fig.62.

Fig.62 thể hiện kết quả so sánh trình tự nucleotit của trình tự tín hiệu của hu806 + trình tự VH (8C65AAG hu806 chuỗi VH; SEQ ID NO:192) với trình tự của mAb806 tương ứng [chuỗi VH của mAb806 trước khi thay đổi codon (cc) và ngụy trang (ven); SEQ ID NO:191]. Sự thay đổi các nucleotit bên cạnh các thay đổi axit amin trên Fig.59 và 60 cũng được minh họa, cũng như thể hiện sự thay đổi axit nucleic bảo toàn mà dẫn đến việc không thay đổi axit amin. Intron nằm giữa trình tự tín hiệu và chuỗi VH trong hu806 đã được loại bỏ để quan sát dễ hơn. Trình tự tín hiệu và các CDR được gạch chân. Trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO:42) được đặt lên trên cùng khi so sánh trình tự.

Fig.63 thể hiện sự liên kết của kháng thể hu806 đã tinh chế thu được từ các tế bào 293 chuyển nhiễm tạm thời với EGFR-ECD tái tổ hợp như được xác định bằng

Biacore. Không quan sát thấy liên kết với EGFR-ECD của kháng thể IgG1 ở người đã tinh chế được sử dụng làm đối chứng.

Fig.64 thể hiện tài liệu dạng chữ được định dạng theo ngân hàng gen của trình tự (SEQ ID NO:41) và các chú thích về plasmit 8C65AAG mã hóa IgG1 hu806.

Fig.65 thể hiện kết quả so sánh trình tự axit amin cho các CDR từ mAb806 (các SEQ ID NO:15-18, 20 và 193) và mAb175 (các SEQ ID NO:130-132, 135 và 194-195). Sự khác nhau về trình tự giữa hai kháng thể được in đậm.

Fig.66A và 66B thể hiện kết quả nhuộm màu hóa mô miễn dịch đối với các dòng tế bào và bình thường của gan người bằng mAb175. (A) mAb175 được biotin hóa được sử dụng để nhuộm màu các phần được chuẩn bị từ các khối u chứa các tế bào A431 (biểu hiện quá mức wtEGFR), các tế bào U87MG.Δ2-7 (biểu hiện Δ2-7EGFR) và các tế bào U87MG (biểu hiện wtEGFR ở mức vừa phải). (B) Sự nhuộm màu ở gan người bình thường (400x) bằng mAb175 (bảng bên trái), đối chứng cùng lớp (bảng giữa) và kháng thể thứ hai được sử dụng làm đối chứng (bảng bên phải). Không phát hiện thấy sự nhuộm màu hình sin hoặc tế bào gan.

Fig.67A, Fig.67B và Fig.67C thể hiện hoạt tính của mAb806 và mAb175 với các mảnh của EGFR được biểu hiện trên nấm men. (A) Biểu đồ thể hiện kết quả của phép đo dòng tế bào đại diện mô tả giá trị trung bình của tín hiệu huỳnh quang của khi mAb175 và mAb806 đánh dấu các mảnh EGFR được biểu hiện ở nấm men. Với nấm men biểu hiện tỷ lệ % tế bào không biểu hiện protein trên bề mặt của chúng tạo ra hai đỉnh trong biểu đồ. Kháng thể 9E10 được sử dụng làm đối chứng dương như tất cả các mảnh chứa đuôi c-myc ở đầu C. (B) Tóm tắt liên kết kháng thể với các mảnh EGFR khác nhau. (C) các mảnh EGFR được làm biến tính bằng cách gia nhiệt tế bào nấm men đến 800°C trong 30 phút. Đuôi c-myc vẫn nhận biết được bởi kháng thể kháng myc 9E10 trong tất cả các trường hợp, điều này cho thấy việc xử lý bằng nhiệt không ảnh hưởng đến protein được biểu hiện trên bề mặt nấm men. Kháng thể mAb225 EGFR nhạy với cấu hình được sử dụng để khẳng định sự biến tính.

Fig.68A, Fig.68B, Fig.68C và Fig.68D thể hiện tác dụng kháng khối u của mAb175 trên khối u ghép não và tuyến tiền liệt khác loài. (A) Chuột nhắt (n = 5) mang mảnh ghép khác loài U87MG.Δ2-7 được tiêm dưới màng bụng bằng PBS, 1 mg mAb175 hoặc mAb806 (đối chứng dương), ba lần hằng tuần trong hai tuần vào các

ngày 6, 8, 10, 13, 15 và 17 khi thể tích khối u ban đầu đạt 100 mm^3. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± SE. (B) Các tế bào được nhuộm màu bằng hai kháng thể không liên quan (xanh lục, đặc và xanh lá, trắng), mAb 528 đối với EGFR tổng số (hồng, đậm), mAb806 (xanh lục nhạt, trắng) *và* mAb175 (màu cam, trắng) và sau đó, phân tích bằng FACS. (C) các tế bào DU145 được làm tan bào, tiến hành IP với mAb 528, mAb806, mAb175 hoặc hai kháng thể độc lập và không liên quan và sau đó, thẩm tách cho EGFR. (D) chuột nhắt (n = 5) mang mảnh ghép khác loài DU145 được tiêm trong màng bụng bằng PBS, 1 mg mAb175 hoặc mAb806, hàng ngày vào các ngày 18-22, 25-29 và 39-43 thể tích khối u ban đầu đạt 85 mm^3. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của khối u ± SE.

Fig.69A, Fig.69B, Fig.69C, Fig.69D, Fig.69E và Fig.69F thể hiện cấu trúc tinh thể của peptit 287-302 của EGFR liên kết với các mảnh Fab (A) mẫu Fab 806, với chuỗi nhẹ, màu đỏ; chuỗi nặng, màu xanh lam; peptit ở dạng liên kết, màu vàng; và $EGFR_{287-302}$ bị chồng lấn từ EGFR, màu tía. (B) mẫu Fab 175 với chuỗi nhẹ, màu vàng; chuỗi nặng, xanh lá; peptit ở dạng liên kết, màu hoa cà; và $EGFR_{287-302}$ từ EGFR(DI-3), màu tía. (C) chi tiết từ (B) cho thấy tính tương tự của $EGFR_{287-302}$ trong thụ thể với peptit ở dạng liên kết với FAb 175. Khung của peptit được thể hiện dưới dạng vết Cα và các mạch nhánh tương tác dưới dạng que. Các nguyên tử O được tô màu đỏ; N, màu xanh lam; S, màu cam và C, tương tự như mạch chính. (D) sự chồng lấn của EGFR bởi phức chất Fabl75:peptit cho thấy có sự chồng lấn về mặt không gian. Màu sắc như trong (C) với bề mặt của EGFR187-286 được tô màu ngọc lam. (E) Hình chiếu trực giao đến (D) với EGFR187-286 được thể hiện bằng màu xanh lam đục và bề mặt của chuỗi nhẹ (màu cam) và nặng (xanh lá) là trong suốt. (F) Hình chiếu không gian chi tiết của phức 175 Fab hướng về vị trí liên kết kháng nguyên. Màu sắc như trong (C) và các liên kết của hydro ở mạch nhánh được đánh dấu bằng các chấm đen. Các phân tử bị ẩn khi tạo phức được thể hiện bằng các quả cầu đỏ.

Fig.70A, Fig.70B, Fig.70C và Fig.70D cho thấy ảnh hưởng của liên kết xystein 271-283 đến liên kết của mAb806 với EGFR. (A) Các tế bào được chuyển nhiễm bằng wtEGFR, EGFR-C271A, EGFR-C283A hoặc thể đột biến C271A/C283A được nhuộm màu bằng mAb528 (biểu đồ màu hồng đậm), mAb806 (đường màu xanh) hoặc chỉ có kháng thể thứ hai (màu tía) và sau đó, phân tích bằng FACS. Kết quả được cài đặt sử dụng kháng thể không liên quan nhưng tương hợp về lớp. (B) tế bào BaF3 biểu hiện

EGFR- C271A hoặc C271/283A EGFR được thử nghiệm khả năng đáp ứng của chúng đối với EGF trong thử nghiệm MTT như đã mô tả. EC_{50S} thu được bằng cách sử dụng chương trình làm tương thích Bolzman đối với các điểm số liệu. Số liệu đưa ra là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của 3 lần đo lặp lại. (C) các tế bào BaF3 biểu hiện EGFR kiểu dại hoặc EGFR- C271A/C283A là IL-3 và huyết thanh được hút ra, sau đó cho tiếp xúc với EGF hoặc đối chứng là tá dược. Các dịch tan tế bào toàn phần được phân tách trên SDS-PAGE và thẩm tách bằng kháng thể kháng phosphoTyrosin (bảng trên cùng) hoặc kháng thể kháng EGFR (bảng dưới cùng). (D) các tế bào BaF3 biểu hiện EGFR kiểu dại (bảng bên trái) hoặc EGFR C271A/C283A (bảng bên phải) được kích thích bằng EGF với nồng độ tăng dần khi không có mặt kháng thể (các ký hiệu trắng), khi có mặt kháng thể mAb 528 (các vòng tròn màu xám) hoặc mAb806 (các tam giác màu đen), cả hai đều ở nồng độ 10 μg/ml. Số liệu đưa ra là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của 3 lần đo lặp lại.

Fig.71A, Fig.71B và Fig.71C thể hiện: (A) ảnh chụp toàn thân bằng máy ảnh gama đối với sự phân bố sinh học của ^{111}In ch806 ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy di căn của dây thanh quản, thể hiện mức dung nạp cao trong khối u ở bên phải (mũi tên). Hoạt tính tập trung máu, và sự chuyển hóa nhỏ của ^{111}In trong gan, cũng được quan sát thấy. (B) Ảnh SPECT tại cổ của bệnh nhân này, cho thấy mức dung nạp ^{111}In-ch806 ở khối u nhìn thấy (mũi tên), với mức dung nạp trung tâm giảm thể hiện sự hoại tử. (C) Ảnh quét CT tương ứng của cổ thể hiện khối u lớn bên phải cổ lớn (mũi tên) với sự hoại tử ở trung tâm.

Fig.72A và Fig.72B thể hiện mô hình không gian cấu trúc của EGFRl-621 không nối. Khung chính của thụ thể này được thể hiện bằng màu xanh lam và phối tử TGF-α được thể hiện bằng màu đỏ. Epitop mAb806/175 được thể hiện bằng màu ngọc lam và các liên kết disulfua được thể hiện bằng màu vàng. Các nguyên tử của liên kết disulfua mà nối với epitop hướng vào trong thụ thể này được nêu ở dạng lấp đầy không gian (mô hình 3D). Mô hình này được xây dựng bằng cách cắt bớt vùng CD2 của EGFR-ECD ra khỏi cấu hình nối trên cấu trúc của monome EGFR không nối khi có mặt phối tử của nó.

Fig.73 thể hiện hoạt tính của mAb806 với các mảnh của EGFR. Các dịch tan từ các tế bào 293T được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện mảnh 1-501 EGFR tan

hoặc các protein dung hợp mảnh GH/EGFR (GH-274-501, GH-282-501, GH-290-501 và GH-298-501) được phân giải trên SDS-PAGE, chuyển lên màng và thẩm tách bằng mAb806 (bảng bên trái) hoặc kháng thể kháng-myc 9B11 (bảng bên phải).

Fig.74A và Fig.74B lần lượt thể hiện trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:128) và axit amin (SEQ ID NO:129) của chuỗi VH của mAb175.

Fig.75A và Fig.75B lần lượt thể hiện trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:133) và axit amin (SEQ ID NO:134) của chuỗi VH của mAb175.

Fig.76A, Fig.76B và Fig.76C thể hiện: (A) nồng độ sản phẩm theo thể tích và (B) nồng độ tế bào sống sót của các thể chuyễn nhiễm GS-CHO (14D8, 15B2 và 40A10) và GS-NS0 (36) hu806 trong môi trường nuôi cấy trong ống nghiệm quy mô nhỏ (100 mL). Nồng độ sản phẩm được ước tính bằng thử nghiệm ELISA bằng cách sử dụng kháng thể kháng genotyp 806 làm kháng thể phủ và ch806 lô lâm sàng: J06024 làm chất chuẩn; (C) sự phát triển tế bào chuyển nhiễm GS-CHO 40A10 và năng suất theo thể tích trong thiết bị sinh học dạng thùng có cánh khuấy dung tích 15L. Mật độ tế bào sống sót (◆ x 10^5 tế bào/mL), khả năng sống sót của tế bào (■) và năng suất (▲mg/L).

Fig.77A, Fig.77B, Fig.77C, Fig.77D và Fig.77E thể hiện kết quả phân tích bằng sắc ký phân tách theo kích thước (Biosep SEC-S3000) của các cấu trúc kháng thể hu806 được tinh chế trên Protein-A và được tạo ra bằng môi trường nuôi cấy quy mô nhỏ và đối chứng ch806 và mAb806. Các sắc ký đồ ở bước sóng A214nm được nêu trong các bảng trên cùng và ở bước sóng A280nm trong bảng dưới cùng của mỗi hình.

Fig.78 thể hiện kết quả phân tích bằng sắc ký phân tách theo kích thước (Biosep SEC-S3000) đối với các cấu trúc của kháng thể hu806 40A10 sau khi sản xuất trên quy mô lớn và tinh chế trên Protein-A. Các sắc ký đồ ở bước sóng A214nm cho thấy độ tinh khiết là 98,8% với tỷ lệ là 1,2%.

Fig.79 thể hiện gel 4-20% Tris/Glyxin đúc sẵn do Novex, USA cung cấp được sử dụng trong các điều kiện SDS-PAGE tiêu chuẩn để phân tích các chế phẩm của hu806 chuyển nhiễm đã tinh chế (5 μg) GS CHO (14D8, 15B2 và 40A10) và GS-NS0 (36) hu806 trong các điều kiện khử. Các protein được phát hiện bằng thuốc nhuộm xanh Coomassie.

Fig.80 thể hiện gel 4-20% Tris/Glyxin đúc sẵn được sử dụng trong các điều kiện SDS-PAGE tiêu chuẩn để phân tích các chế phẩm của hu806 chuyển nhiễm đã tinh chế (5 μg) GS CHO (14D8, 15B2 và 40A10) và GS-NS0 (36) hu806 trong các điều kiện không khử. Các protein được phát hiện bằng thuốc nhuộm xanh Coomassie.

Fig.81 thể hiện gel 4-20% Tris/Glyxin đúc sẵn được sử dụng trong các điều kiện SDS-PAGE tiêu chuẩn phân tích các chế phẩm của hu806 chuyển nhiễm đã tinh chế (5 μg) GS CHO 40A10 sau khi sản xuất trên quy mô lớn. Các protein được phát hiện bằng thuốc nhuộm xanh Coomassie.

Fig.82 thể hiện kết quả phân tích bằng gel Focusing đẳng điện của thể truyền nhiễm đã tinh chế hu806 GS CHO 40A10 (5 μg) sau khi sản xuất trên quy mô 15L. Các protein được phát hiện bằng thuốc nhuộm xanh Coomassie. Làn 1, các chất đánh dấu pI; Làn 2, hu806 (ba dạng đồng chức năng, pI từ 8,66 đến 8,82); Làn 3, các chất đánh dấu pI.

Fig.83 thể hiện liên kết với các tế bào A431: Phân tích đo dòng tế bào của các chế phẩm chứa kháng thể hu806 được tinh chế trên Protein - A (20 μg/ml), và đối chứng cùng lớp huA33 (20 μg/ml). Các đối chứng bao gồm riêng kháng thể thứ hai (màu xanh lá) và ch806 (màu đỏ). Các cấu trúc Hu806 được tạo ra bằng môi trường nuôi cấy quy mô nhỏ.

Fig.84 thể hiện sự liên kết với tế bào A431: Phân tích đo dòng tế bào của các chế phẩm chứa kháng thể mAb806, ch806 và hu806 40A10 đã tinh chế (20 μg/ml) liên kết với khoảng 10% EGFR kiểu dại trên bề mặt tế bào, kháng thể 528 (liên kết với cả EGFR kiểu dại và de2-7 EGFR) và kháng thể đối chứng không liên quan (20 μg/ml) như đã thể hiện.

Fig.85 thể hiện sự liên kết với các tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7. Phân tích đo dòng tế bào của các chế phẩm chứa kháng thể mAb806, ch806 và hu806 40A10 đã tinh chế (20 μg/ml) và kháng thể kháng EGFR 528 và kháng thể đối chứng không liên quan (20 μg/ml).

Fig.86 thể hiện liên kết đặc hiệu của cấu trúc kháng thể 806 được đánh dấu phóng xạ ^{125}I với: (A) các tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7 và (B) tế bào ung thư biểu mô A431.

Fig.87 thể hiện phân tích Scatchard: (A) cấu trúc kháng thể ch806 và (B) cấu trúc kháng thể hu806 được đánh dấu phóng xạ ^{125}I liên kết với các tế bào U87MG.de2-7.

Fig.88 thể hiện phân tích Scatchard: (A) cấu trúc kháng thể ch806 và (B) cấu trúc kháng thể hu806 được đánh dấu phóng xạ ^{125}I liên kết với tế bào A431.

Fig.89A và Fig.89B thể hiện kết quả phân tích BIAcore về liên kết với epitop peptit 287–302 EGFR 806 của (A) hu806 và (B) ch806 bỏ qua peptit được cố định với nồng độ tăng dần 50nM, 100nM, 150nM, 200 nM, 250 nM và 300 nM.

Fig.90A và Fig.90B thể hiện tính gây độc tế bào liên quan đến kháng thể thông qua ch806- và hu806- trên các tế bào đích A431 được xác định ở (A) 1 µg/ml mỗi kháng thể trên một khoảng yếu tố tác động theo tỷ lệ tế bào đích (E:T = từ 0,78:1 đến 100:1); (B) ở E:T = 50:1 trên khoảng nồng độ của từng kháng thể (3,15 ng/ml - 10 µg/ml) đối với tế bào đích A431.

Fig.91 thể hiện việc điều trị mảnh ghép khác loài A431 được tạo ra ở chuột nhắt trụi lông BALB/c. Mỗi nhóm gồm 5 con được nhận 6 x liều 1 mg trong hai tuần điều trị bằng kháng thể theo chỉ định (các mũi tên). Thể tích khối u được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SEM cho đến khi kết thúc thử nghiệm.

Fig.92 thể hiện việc điều trị mảnh ghép khác loài U87MG.de2-7 được tạo ra ở chuột nhắt trụi lông BALB/c. Mỗi nhóm gồm 5 con được nhận 6 x liều 1 mg trong hai tuần điều trị bằng kháng thể theo chỉ định (các mũi tên). Thể tích khối u được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SEM cho đến khi kết thúc thử nghiệm.

Fig.93 thể hiện độ lệch chuẩn của giá trị độ chuyển dịch hóa học do cuộn ngẫu nhiên đối với peptit (A) N, (B) HN và (C) HA của mAb806. Peptit được chuẩn bị trong dung dịch H_2O chứa 5% H_2O_2, NaCl 70 mM và $NaPO_4$ 50 mM ở độ pH=6,8. Tất cả phổ được sử dụng cho các phép gán liên tục được yêu cầu ở 298K trên thiết bị Bruker Avance500.

Fig.94A, Fig.94B, Fig.94C, Fig.94D, Fig.94E và Fig.94F là các ảnh chụp toàn thân bằng máy ảnh gama cho Bệnh nhân số 7, A) trước, và B) sau, ngày thứ 5 sau khi truyền ^{111}In-ch806. Mức dung nạp ^{111}In-ch806 cao ở các thương tổn di căn trong phổi (các mũi tên) là rõ ràng. C) và D) thể hiện các thương tổn di căn (các mũi tên) trên ảnh

quét CT. E) các ảnh 3D SPECT của ngực, và F) các ảnh SPECT và CT xuyên trục cùng được ghi cho thấy sự dung nạp đặc hiệu ^{11}In-ch806 trong các thương tổn di căn.

Fig.95A, Fig.95B, Fig.95C, Fig.95D, Fig.95E và Fig.95F là ảnh chụp hai chiều của đầu và cổ của Bệnh nhân số 8 thu được A) Ngày thứ 0, B) Ngày thứ 3 và C) Ngày thứ 7 sau khi truyền ^{111}In-ch806. Hoạt tính tập trung máu ban đầu được thấy vào ngày thứ 0, và sự dung nạp ^{111}In-ch806 trong u sao bào mất biệt hóa trong thùy trán phải là rõ ràng vào ngày thứ 3 (mũi tên), và tăng vào ngày thứ 7. Sự dung nạp đặc hiệu ^{111}In-ch806 được khẳng định trong D) ảnh SPECT của não (mũi tên), ở vị trí u (mũi tên) rõ ràng trong E) ^{18}F-FDG PET và F) MRI.

Fig.96A, Fig.96B, Fig.96C và Fig.96D cho thấy mức dung nạp ^{111}In-ch806 tương tự ở mô trong Bệnh nhân số 3 là rõ ràng so với Bệnh nhân số 4, mặc dù có sự khác nhau giữa sự biểu hiện kháng nguyên 806 trong các mẫu u đã sàng lọc. A) cố định ^{111}In-ch806 trong u di căn phổi (mũi tên) trên ảnh xuyên trục SPECT ở Bệnh nhân số 4, với hoạt tính tập trung máu tim (B) là rõ ràng. B) ảnh quét CT tương ứng. < 10% khối u có biểu hiện 806. C) cố định ^{111}In-ch806 trong u di căn phổi (mũi tên) ở Bệnh nhân số 3, với hoạt tính tập trung máu tim (B) là rõ ràng. D) ảnh quét CT tương ứng. 50-70% khối u thu được có biểu hiện 806.

Fig.97 thể hiện dược động học quần thể liên hiệp của protein ch806 được xác định bằng thử nghiệm ELISA. ch806 quan sát được và được phỏng đoán (%ID/L) có mối quan hệ tương ứng theo thời gian sau khi truyền (giờ).

Fig.98A và 98B thể hiện kết quả thu được ở từng bệnh nhân của A) độ thanh thải toàn thân đã chuẩn hóa và B) độ thanh thải ở gan của ^{111}In-ch806 ở các mức liều dùng 5 mg/m^2 (■), 10 mg/m^2 (△), 20 mg/m^2 (▽), và 40 mg/m^2 (◆). Kết quả phân tích hồi quy tuyến tính cho các bộ số liệu được thể hiện trong mỗi bảng [A) r^2= 0,9595; B) r^2 = 0,9415].

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, các kỹ thuật sinh học phân tử, vi sinh và ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng và các kỹ thuật này đều thuộc kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này cũng được giải thích đầy đủ trong các tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, trong tài liệu: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"

(1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-E [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994))]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Theo sáng chế, các thuật ngữ sau đây được định nghĩa, mà không có hạn chế bất kỳ.

Thuật ngữ "phần tử liên kết đặc hiệu" mô tả thành viên của một cặp phân tử và có tính liên kết đặc hiệu với phần tử còn lại. Các phần tử của một cặp liên kết đặc hiệu có thể thu được một cách tự nhiên hoặc được tổng hợp một phần. Một trong số hai phần tử của cặp phân tử này có một khu vực nằm trên bề mặt của nó, hoặc một khoang, liên kết đặc hiệu với và do đó, bổ trợ cho một khu vực phân cực và có không gian cụ thể của phần tử còn lại của cặp phân tử đó. Do đó, các phần tử của cặp phân tử này có đặc tính liên kết đặc hiệu với nhau. Ví dụ về các kiểu cặp liên kết đặc hiệu là kháng nguyên - kháng thể, biotin-avidin, hormon - thụ thể hormon, thụ thể - phối tử, enzym - cơ chất. Sáng chế này chỉ đề cập đến các phản ứng kiểu kháng nguyên - kháng thể.

Thuật ngữ “biểu hiện bất thường" ở các dạng ngữ pháp khác nhau có thể mang nghĩa hoặc bao gồm sự biểu hiện bất kỳ được tăng cường hoặc thay đổi hoặc sự biểu hiện quá mức một protein trong mô, ví dụ tăng lượng protein, do nguyên nhân bất kỳ bao gồm sự tăng biểu hiện hoặc dịch mã, việc điều biến gen khởi đầu, hoặc sự điều hòa protein, sự khuếch đại gen cho một protein, hoặc thời gian bán hủy hoặc độ ổn định tăng, đến mức nhiều protein cùng tồn tại hoặc có thể được phát hiện ở một thời điểm bất kỳ, trái ngược với trạng thái không được biểu hiện quá mức. Sự biểu hiện bất thường bao gồm và dự định bao gồm trường hợp biểu hiện bất kỳ hoặc sự thay đổi bất kỳ trong đó sự biểu hiện protein hoặc cơ chế cải biến sau dịch mã trong tế bào tăng lên hoặc nếu không thì bị phá vỡ do sự biểu hiện tăng hoặc các mức hoặc các lượng protein gia tăng, bao gồm trong đó protein bị biến đổi, như trong protein bị đột biến hoặc cải biến do sự thay đổi trình tự, loại bỏ hoặc chèn, hoặc sự gấp nếp bị thay đổi.

Cần hiểu rằng thuật ngữ "biểu hiện bất thường" theo sáng chế bao gồm trạng thái bất thường (thường là tăng) về lượng/mức protein có mặt, bất kể nguyên nhân tạo ra lượng hoặc mức bất thường đó. Do đó, các lượng protein bất thường có thể do sự biểu hiện quá mức protein này khi có mặt sự khuếch đại gen, đó là, ví dụ trong trường hợp nhiều mẫu tế bào/mô lấy từ đầu và cổ của các đối tượng mắc ung thư, hoặc các mẫu khác biểu hiện các mức protein bất thường có thể do sự khuếch đại gen.

Trong trường hợp thứ hai, một phần sáng chế được các tác giả nêu ở đây nhằm minh họa sáng chế sẽ bao gồm cả việc phân tích mẫu mà một phần trong số các mẫu này biểu hiện mức protein bất thường do sự khuếch đại EFGR. Do đó, đây là lý do giải thích cho việc đưa vào các phát hiện mang tính thử nghiệm ở đây, trong đó có viện dẫn đến sự khuếch đại và để sử dụng các thuật ngữ "sự khuếch đại/được khuếch đại" và các thuật ngữ tương tự khi mô tả mức EFGR bất thường. Tuy nhiên, đó là kết quả quan sát được về lượng hoặc mức bất thường của protein mà dự kiến xác định được môi trường hoặc hoàn cảnh mà trong đó xảy ra tương tác lâm sàng, cụ thể là các phần tử liên kết theo sáng chế, và vì thế nên thuật ngữ "biểu hiện bất thường" theo sáng chế có nghĩa rộng hơn với nhiều môi trường có tính nguyên nhân gây ra mức EFGR tương ứng.

Do đó, khi thuật ngữ "biểu hiện quá mức" và "khuếch đại" ở các dạng ngữ pháp khác nhau được hiểu là với các nghĩa kỹ thuật khác nhau, chúng được coi là tương đương với nhau, tới mức chúng chỉ trạng thái trong đó mức protein EFGR là bất thường theo sáng chế. Do đó, thuật ngữ "biểu hiện bất thường" được sử dụng bao hàm cả thuật ngữ "biểu hiện quá mức" và "khuếch đại" trong phạm vi của nó cho các mục đích theo sáng chế, sao cho tất cả các thuật nữ này có thể được coi là tương đương với nhau như được sử dụng theo sáng chế.

Thuật ngữ "kháng thể" mô tả phân tử globulin miễn dịch bất kể chúng được tạo ra theo cách tự nhiên hoặc được tổng hợp một phần hoặc toàn phần. Thuật ngữ này cũng bao gồm polypeptit hoặc protein bất kỳ có miền liên kết là, hoặc tương đồng với, miền liên kết kháng thể. Các kháng thể được ghép CDR cũng nằm trong phạm vi của thuật ngữ này.

Khi các kháng thể có thể được cải biến theo một số cách thì thuật ngữ “kháng thể” cần được hiểu là bao gồm phần tử liên kết đặc hiệu bất kỳ hoặc chất có miền liên

kết mà có tính đặc hiệu yêu cầu. Do đó, thuật ngữ này bao gồm cả các mảnh kháng thể, các dẫn xuất, các chất tương đương về mặt chức năng hoặc các chất tương đồng của kháng thể, bao gồm polypeptit bất kỳ chứa miền liên kết của phân tử globulin miễn dịch, bất kể chúng được tạo ra theo cách tự nhiên hoặc được tổng hợp một phần hoặc toàn phần. Do đó, các phân tử khảm bao gồm miền liên kết của phân tử globulin miễn dịch, hoặc tương đương của nó, dung hợp với polypeptit khác vẫn thuộc phạm vi của thuật ngữ này. Việc tách dòng và biểu hiện các kháng thể khảm như được mô tả trong EP-A-0120694 và EP-A-0125023 và US 4,816,397 và 4,816,567.

Cần lưu ý rằng các mảnh của kháng thể có chiều dài toàn phần có thể có chức năng liên kết với kháng nguyên. Ví dụ về các mảnh có chức năng liên kết (sau đây gọi là các mảnh liên kết là (i) mảnh Fab bao gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh Fd bao gồm miền VH và miền CH1; (iii) mảnh Fv bao gồm các miền VL và VH của kháng thể chuỗi đơn; (iv) mảnh dAb (Ward, E.S. et al. (1989) Nature 341,544-546) mà bao gồm miền VH; (v) các vùng CDR được tách; (vi) các mảnh F (ab') 2, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab liên kết với nhau (vii) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó miền VH và miền VL được liên kết với nhau thông qua một liên kết peptit cho phép hai miền kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết với kháng nguyên (Bird et al. (1988) Science. 242,423-426; Huston et al. (1988) PNAS USA. 85,5879-5883); (viii) các mảnh kháng thể đa hóa trị (scFv dime, trime và/hoặc tetrame (Power and Hudson (2000) J. Immunol. Methods 242, 193-204) (ix) dime Fv chuỗi đơn đặc hiệu kép (PCT/US92/09965) và (x) "các diabody" (kháng thể hai mảnh), mảnh kháng thể nhiều hóa trị và đa đặc hiệu được tạo thành bằng cách dung hợp gen (W094/13804; P. Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,6444-6448).

Thuật ngữ "vị trí kết hợp của kháng thể" chỉ một phần cấu trúc của phân tử kháng thể bao gồm chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ và các vùng biến đổi và siêu biến của chuỗi nhẹ mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên.

Cụm từ "phân tử kháng thể" ở các dạng ngữ pháp khác nhau được sử dụng theo sáng chế bao gồm cả phân tử globulin miễn dịch và phần có hoạt tính miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch này.

Các phân tử kháng thể được lấy làm ví dụ là các phân tử globulin miễn dịch, thực chất là các phân tử globulin miễn dịch và các phần của phân tử globulin miễn dịch có

vị trí dính bám, bao gồm các phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như Fab, Fab', F (ab') Z và F (v), các phần này được ưu tiên sử dụng trong các phương pháp điều trị bệnh theo sáng chế.

Kháng thể có thể cũng có tính đặc hiệu kép, trong đó một miền liên kết của kháng thể này là phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, và miền liên kết khác có tính đặc hiệu khác, ví dụ để phục hồi chức năng tác động hoặc các chức năng tương tự khác. Các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm, trong đó một miền liên kết của kháng thể này là phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, kể cả mảnh của nó, và miền liên kết khác là kháng thể khác hoặc mảnh của nó, bao gồm kháng thể kháng EGFR khác, ví dụ kháng thể 528 (US 4,943,533), kháng thể khảm và được làm giống như của người 225 (US 4,943,533 và WO/9640210), kháng thể kháng de2-7 EGFR như DH8.3 (Hills, D. et al (1995) Int. J. Cancer. 63(4), 537-543), kháng thể L8A4 và Y10 (Reist, CJ et al. (1995) Cancer Res. 55 (19):4375-4382; Foulon CF et al. (2000) Cancer Res. 60 (16):44534460), ICR62 (Modjtahedi H et al. (1993) Cell Biophys. Jan-Jun; 22 (1-3):129-46; Modjtahedi et al. (2002) P. A. A. C. R. 55 (14):3140-3148, hoặc kháng thể của Wikstrand và cộng sự (Wikstrand C. et al (1995) Cancer Res. 55 (14):3140-3148). Miền liên kết khác có thể là kháng thể nhận biết hoặc hướng đích là một loại tế bào cụ thể, như trong kháng thể đặc hiệu với tế bào não hoặc khối u thần kinh đệm. Trong các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, một miền liên kết của kháng thể này theo sáng chế có thể được kết hợp với các miền liên kết khác hoặc các phân tử nhận biết các thụ thể tế bào cụ thể và/hoặc điều hòa tế bào theo một cách cụ thể, ví dụ, chất điều hòa miễn dịch (ví dụ, (các) interleukin), chất điều hòa sinh trưởng hoặc xytokin (ví dụ, yếu tố hoạt tử khối u (tumor necrosis factor: TNF), và cụ thể, phương thức đặc hiệu kép TNF được mô tả trong U.S.S.N. 60/355,838 nộp ngày 13/2/2002) hoặc độc tố (ví dụ, rixin) hoặc chất hoặc yếu tố chống phân bào hoặc gây chết tế bào theo chương trình.

Các phần Fab và $F(ab')_2$ của các phân tử kháng thể có thể được tạo ra bằng phản ứng thủy phân bằng cách sử dụng enzym papain và pepsin, tương ứng, thực chất là các phân tử kháng thể nguyên vẹn bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, xem US 4,342,566 của Theofilopolous và cộng sự. Các mảnh Fab' của phân tử kháng thể cũng đã biết và được tạo ra từ các phần F (ab') 2 sau khi khử các liên kết disufit nối hai phần của chuỗi nặng với nhau, ví dụ bằng mercaptoetanol, và sau đó, alkyl hóa protein

mercaptan thu được bằng thuốc thử như iotaxetamit. Theo đó, thu được kháng thể bao gồm các phân tử kháng thể nguyên vẹn được ưu tiên.

Cụm từ "kháng thể đơn dòng" ở các dạng ngữ pháp khác nhau chỉ kháng thể chỉ có một vị trí kết hợp của kháng thể mà khả năng tương tác miễn dịch với một kháng nguyên cụ thể. Do đó, kháng thể đơn dòng thường có duy nhất một ái lực liên kết với kháng nguyên bất kỳ mà tương tác miễn dịch với nó. Kháng thể đơn dòng có thể bao gồm cả phân tử kháng thể có nhiều vị trí kết hợp của kháng thể, mỗi vị trí này là đặc hiệu miễn dịch với một kháng nguyên khác nhau; ví dụ, kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép (khảm).

Thuật ngữ "miền liên kết kháng nguyên" chỉ một phần của kháng thể mà chứa vùng liên kết đặc hiệu và được dự định là liên kết với một phần hoặc toàn bộ kháng nguyên. Khi phân tử kháng nguyên lớn thì kháng thể có thể chỉ liên kết đặc hiệu với một phần cụ thể của kháng nguyên đó, vùng này được gọi là epitop. Miền liên kết kháng nguyên có thể được một hoặc nhiều miền biến đổi của kháng thể tạo ra. Tốt hơn, nếu miền liên kết kháng nguyên này chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (light chain variable region - VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (heavy chain variable region - VH).

Thuật ngữ "cải biến sau dịch mã" bao gồm biến thể bất kỳ hoặc tổ hợp các cải biến, kể cả cải biến đồng hóa trị, trong đó protein sau dịch mã là một protein hoàn chỉnh và được giải phóng khỏi ribosom hoặc trên polypeptit cùng dịch mã. Cải biến sau dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phosphoryl hóa, myristyl hóa, ubiquitin hóa, glycosyl hóa, gắn kết đồng enzym, metyl hóa và axetyl hóa. Cải biến sau dịch mã có thể điều biến hoặc ảnh hưởng đến hoạt tính của protein, đích nội bào hoặc ngoại bào của nó, độ ổn định hoặc thời gian bán hủy của nó, và/hoặc có khả năng nhận biết bởi các phối tử, thụ thể hoặc các protein khác. Cải biến sau dịch mã có thể xảy ra trong các bào quan, trong nhân hoặc trong tương bào hoặc bên ngoài tế bào.

Thuật ngữ "đặc hiệu" chỉ trường hợp trong đó một phần tử của một cặp liên kết đặc hiệu không thể hiện khả năng liên kết đáng kể với các phân tử không phải là phân tử liên kết đặc hiệu của nó. Thuật ngữ này cũng được sử dụng khi, ví dụ miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu với một epitop cụ thể có trên kháng nguyên, trong trường hợp

này phần tử liên kết đặc hiệu mang miền liên kết kháng nguyên sẽ có khả năng liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác nhau có epitop đó.

Thuật ngữ "bao gồm" thường được sử dụng với nghĩa bao gồm một hoặc nhiều đặc tính hoặc thành phần.

Thuật ngữ "chủ yếu chứa" chỉ sản phẩm, cụ thể là trình tự peptit, có một số xác định các gốc không liên kết đồng hóa trị với sản phẩm lớn hơn. Tuy nhiên, trong trường hợp peptit theo sáng chế được đề cập ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng các cải biến nhỏ đối với đầu N hoặc C của peptit có thể cũng bao gồm, các cải biến hóa học đối các các đầu bằng cách bổ sung nhóm bảo vệ hoặc các nhóm khác tương tự, ví dụ amit hóa đầu C.

Thuật ngữ "được phân lập" chỉ trạng thái của các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, hoặc axit nucleic mã hóa các phần tử liên kết theo sáng chế. Các phần tử và axit nucleic sẽ không chứa hoặc gần như không chứa vật liệu kết hợp một cách tự nhiên với nó như các polypeptit hoặc axit nucleic khác có trong môi trường tự nhiên hoặc trong môi trường mà chúng được tạo ra (ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào) khi việc tạo ra này được thực hiện bằng công nghệ ADN tái tổ hợp *in vitro* hoặc *in vivo*. Các phần tử và axit nucleic này có thể được bào chế theo công thức với chất pha loãng hoặc tá dược nhưng nhằm mục đích tách – ví dụ các phần tử này thường được trộn với gelatin hoặc các chất mang khác nếu nó được sử dụng để phủ lên các đĩa vi chuẩn độ để sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch, hoặc được trộn với các chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng khi được sử dụng để chẩn đoán hoặc điều trị. Các phần tử liên kết đặc hiệu có thể được glycosyl hóa, một cách tự nhiên hoặc bằng cách hệ thống tế bào nhân chuẩn khác loài, hoặc chúng có thể (ví dụ, nếu được tạo ra bằng cách biểu hiện trong tế bào tiền nhân) không được glycosyl hóa.

Tương tự, theo sáng chế, thuật ngữ "glycosyl hóa" và "được glycosyl" bao gồm sự cải biến sau dịch mã các protein, gọi chung là các glycoprotein, bằng cách bổ sung các oligosacarit. Các oligosacarit được bổ sung vào vị trí glycosyl hóa trong các glycoprotein, cụ thể là bao gồm các oligosacarit được liên kết tại vị trí N và các oligosacarit được liên kết ở vị trí O. Các oligosacarit được liên kết tại vị trí N được bổ sung vào gốc Asn, cụ thể là ở đây gốc Asn nằm trong trình tự N-X-S/T, trong đó X là Pro hoặc Asp, và là một gốc phổ biến tìm thấy trong các glycoprotein. Trong sinh tổng

hợp các glycoprotein được liên kết tại vị trí N, oligosacarit loại có hàm lượng manoza cao (thường cấu tạo từ dolichol, N-Axetylglucosamin, manoza và glucoza được tạo thành đầu tiên trong mô lưới nội chất (endoplasmic reticulum: ER). Các glycoprotein loại có hàm lượng manoza cao này sẽ được vận chuyển từ ER vào Golgi, tại đây việc xử lý và cải biến các oligosacarit tiếp tục diễn ra. Các oligosacarit được liên kết tại vị trí O được bổ sung vào nhóm hydroxyl của các gốc Ser hoặc Thr. Trong các oligosacarit được liên kết tại vị trí O, N-Axetylglucosamin đầu tiên được vận chuyển đến gốc Ser hoặc Thr bằng enzym N-Axetylglucosaminyltransferaza trong ER. Sau đó, protein này di chuyển đến Golgi tại đây chúng được cải biến và kéo dài mạch. Các cải biến liên kết tại vị trí O có thể xuất hiện bằng cách đơn giản là chỉ bổ sung OGlcNAc monosacarit vào vị trí Ser hoặc Thr của chúng mà cũng có thể được phophoryl hóa trong các điều kiện khác chứ không chỉ được glycosyl hóa.

Theo sáng chế, "pg" có nghĩa là picogam, "ng" có nghĩa là nanogam, "ug" hoặc “µg” có nghĩa là microram, "mg" có nghĩa là milligam, “ul" hoặc “µl” có nghĩa là microlit, “ml" có nghĩa là millilit, "1" có nghĩa là lít.

Các thuật ngữ "kháng thể 806", "mAb806", "ch806", và biến thể bất kỳ không được liệt kê cụ thể ở đây, có thể được sử dụng thay thế cho nhau và được sử dụng theo sáng chế chỉ vật liệu protein chứa một hoặc nhiều protein, và cũng bao gồm các protein có số trình tự axit amin được mô tả theo sáng chế như trình tự được nêu trong SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:4, và kháng thể khảm ch806 được kết hợp vào và tạo thành một phần của trình tự nêu trong SEQ ID NOS:7 và 8, và profil hoạt tính được xác định theo sáng chế. Do đó, sáng chế dự kiến bao gồm cả protein biểu hiện hoạt tính gần như tương đương hoặc được cải biến tương tự. Các cải biến này có thể có chủ đích, ví dụ, như các cải biến thu được thông qua gây đột biến điểm trực tiếp, hoặc có thể là không chủ đích, như các cải biến thu được thông qua các đột biến ở trong các vật chủ mà là nguồn tạo ra phức hoặc các tiểu đơn vị của nó. Tương tự, các thuật ngữ "kháng thể 806", "mAb806" và "ch806" dự kiến thuộc phạm vi của các protein được nêu cụ thể ở đây cũng bao gồm cả các chất tương tự gần như tương đồng và các biến thể alen.

Thuật ngữ “kháng thể 806 được làm giống như của người”, “hu806”, và "kháng thể 806 được tạo vỏ bọc" và biến thể bất kỳ không được liệt kê cụ thể ở đây, có thể

được sử dụng thay thế cho nhau, và được sử dụng theo sáng chế chỉ vật liệu protein, kể cả các protein có trình tự axit amin được mô tả theo sáng chế và có trình tự nêu trong SEQ ID NO:42 và SEQ ID NO:47, và profil hoạt tính theo sáng chế. Do đó, chúng dự định bao gồm các protein biểu hiện hoạt tính gần như tương đương hoặc được cải biến tương đồng. Các cải biến này có thể có chủ đích, ví dụ, các cải biến thu được bằng cách gây đột biến điểm trực tiếp, hoặc có thể là không chủ đích, như các cải biến thu được bởi các đột biến trong vật chủ mà là nguồn tạo ra phức hoặc các tiểu đơn vị của nó. Tương tự, các thuật ngữ "kháng thể 806 được làm giống như của người", "hu806", và "kháng thể 806 được ngụy trang" cũng thuộc phạm vi của các protein theo sáng chế, kể cả các chất tương tự gần như tương đồng và các biến thể alen khác.

Các thuật ngữ "kháng thể 175" và "mAb175" và biến thể bất kỳ không được liệt kê cụ thể ở đây, có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và được sử dụng theo sáng chế chỉ vật liệu protein, kể cả các protein có trình tự axit amin được mô tả theo sáng chế và có trình tự nêu trong SEQ ID NO:129 và SEQ ID NO:134, và profil hoạt tính theo sáng chế. Do đó, chúng được dự định bao gồm các protein biểu hiện hoạt tính gần như tương đương hoặc được cải biến tương đồng. Các cải biến này có thể có chủ đích, ví dụ, như các cải biến thu được bằng cách gây đột biến điểm trực tiếp, hoặc có thể là không chủ đích, như các cải biến thu được bởi các đột biến trong vật chủ mà là nguồn tạo ra phức hoặc các tiểu đơn vị của nó. Tương tự, các thuật ngữ " kháng thể 175" và "mAb175" dự kiến thuộc phạm vi của các protein theo sáng chế, kể cả các chất tương tự gần như tương đồng và các biến thể alen.

Thuật ngữ " kháng thể 124" và "mAb124", và biến thể bất kỳ không được liệt kê cụ thể ở đây, có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và được sử dụng theo sáng chế chỉ vật liệu protein, kể cả các các protein có trình tự axit amin được mô tả theo sáng chế và có trình tự nêu trong SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:27, và profil hoạt tính theo sáng chế. Do đó, chúng dự định bao gồm các protein biểu hiện hoạt tính gần như tương đương hoặc được cải biến tương đồng. Các cải biến này có thể có chủ đích, ví dụ, như các cải biến thu được bằng cách gây đột biến điểm trực tiếp, hoặc có thể là không chủ đích, như các cải biến thu được bởi các đột biến trong vật chủ mà là nguồn tạo ra phức hoặc các tiểu đơn vị của nó. Tương tự, các thuật ngữ " kháng thể 124" và "mAb124" dự kiến thuộc phạm vi của các protein theo sáng chế, kể cả cả các chất tương tự gần như tương đồng và các biến thể alen.

Các thuật ngữ "kháng thể 1133" và "mAb1133" và biến thể bất kỳ không được liệt kê cụ thể ở đây, có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và được sử dụng theo sáng chế chỉ vật liệu protein, kể cả các các protein có trình tự axit amin được mô tả theo sáng chế và có trình tự nêu trong SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:37, và profil hoạt tính theo sáng chế. Do đó, chúng được dự định bao gồm các protein biểu hiện hoạt tính gần như tương đương hoặc được cải biến tương đồng. Các cải biến này có thể có chủ đích, ví dụ, như các cải biến thu được bằng cách gây đột biến điểm trực tiếp, hoặc có thể là không chủ đích, như các cải biến thu được bởi các đột biến trong vật chủ mà là nguồn tạo ra phức hoặc các tiểu đơn vị của nó. Tương tự, các thuật ngữ "kháng thể 11133" và "mAb1133" dự kiến thuộc phạm vi của các protein theo sáng chế, kể cả các chất tương tự gần như tương đồng và các biến thể alen.

Các gốc axit amin được mô tả theo sáng chế được ưu tiên ở dạng đồng phân "L". Tuy nhiên, các gốc ở dạng đồng phân "D" có thể được thay thế cho gốc axit amin dạng "L" bất kỳ, miễn là vẫn duy trì được đặc tính chức năng mong muốn của polypeptit đó là liên kết với globulin miễn dịch. NH_2 chỉ nhóm amin tự do có mặt ở đầu amin của polypeptit. COOH chỉ nhóm carboxyl tự do có mặt ở đầu carboxyl của polypeptit. Để tuân theo danh pháp chuẩn của polypeptit, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), các cụm từ viết tắt cho các gốc axit amin được nêu trong Bảng viết tắt tương ứng dưới đây:

Bảng ký hiệu viết tắt tương ứng

Ký hiệu		Axit amin
1-ký tự	3-ký tự	
Y	Tyr	tyrosin
G	Gly	glyxin
F	Phe	phenylalanin
M	Met	methionin
A	Ala	alanin
S	Ser	serin
I	Ile	isoleuxin
L	Leu	leuxin
T	Thr	threonin
V	Val	valin

P	Pro	prolin
K	Lys	lysin
H	His	histidin
Q	Gln	glutamin
E	Glu	axit glutamic
W	Trp	tryptophan
R	Arg	arginin
D	Asp	axit aspartic
N	Asn	aspargin
C	Cys	xystein

Cần lưu ý rằng tất cả các trình tự gốc axit amin được nêu ở đây bằng các công thức có hướng từ trái qua phải là hướng thông lệ tính từ đầu amin đến đầu carboxyl. Ngoài ra, cần chú ý rằng dấu gạch ngang ở gốc đầu hoặc cuối của trình tự axit amin thể hiện peptit liên kết với trình tự khác có một hoặc nhiều gốc axit amin. Bảng nêu trên cũng thể hiện mối liên hệ giữa viết tắt 1 ký tự và 3 ký tự mà chúng có thể thay thế cho nhau theo sáng chế.

Thuật ngữ "đơn vị tái bản" chỉ yếu tố di truyền (ví dụ, plasmit, nhiễm sắc thể, virut) có chức năng như một đơn vị độc lập của quá trình sao chép ADN *in vivo*; nghĩa là, có khả năng sao chép dưới sự kiểm soát của chính mình.

"Vectơ" là một đơn vị tái bản, như plasmit, thể thực khuẩn hoặc cosmit, được gắn với một mảnh ADN khác sao cho có thể sao chép được mảnh được gắn.

"Phân tử ADN" chỉ dạng polyme của các deoxyribonucleotit (adenin, guanin, thymin, hoặc xytosin) ở dạng mạch đơn của nó, hoặc dạng mạch xoắn kép. Thuật ngữ này chỉ đề cập đến cấu trúc bậc một và bậc hai của phân tử, chứ không giới hạn vào dạng cấu trúc bậc ba cụ thể bất kỳ. Do đó, thuật ngữ này bao gồm ADN mạch kép được phát hiện thấy, trong số đó, có các phân tử ADN thẳng (ví dụ, các mảnh giới hạn), virut, plasmit, và nhiễm sắc thể. Khi đề cập đến cấu trúc của một phân tử ADN mạch kép cụ thể, các trình tự theo sáng chế được mô tả theo quy ước chung chỉ áp dụng cho trình tự theo hướng từ 5' đến 3' dọc theo mạch không được phiên mã của ADN (nghĩa là, mạch có trình tự tương đồng với ARN thông tin).

"Khởi đầu sao chép" chỉ các trình tự ADN nêu trên mà tham gia vào quá trình tổng hợp ADN.

"Trình tự mã hóa" ADN là trình tự ADN mạch kép được phiên mã và dịch mã *in vivo* thành polypeptit khi được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự điều hòa thích hợp. Ranh giới của trình tự mã hóa được xác định bằng các codon khởi đầu tại đầu 5' (amin) và codon kết thúc dịch mã tại đầu 3' (carboxy). Trình tự mã hóa có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự trong tế bào tiền nhân, ADN bổ trợ thu được từ ARN thông tin của tế bào nhân chuẩn, các trình tự ADN hệ gen thu được từ ADN của tế bào nhân chuẩn (ví dụ, động vật có vú), và thậm chí là các trình tự ADN tổng hợp. Trình tự tín hiệu polyadenyl hóa và trình tự kết thúc phiên mã thường nằm ở đầu 3' trên trình tự mã hóa.

Các trình tự kiểm soát sự phiên mã và dịch mã là các trình tự điều hòa ADN, như các trình tự khởi đầu, các trình tự tăng cường, các tín hiệu polyadenyl hóa, các trình tự kết thúc và các trình tự tương tự khác để biểu hiện trình tự mã hóa trong tế bào vật chủ.

"Trình tự khởi đầu" là vùng điều hòa ADN có khả năng liên kết với enzym ARN polymeraza trong tế bào và bắt đầu quá trình phiên mã trình tự mã hóa theo hướng xuôi chiều (hướng 3'). Theo sáng chế, trình tự khởi đầu được giới hạn ở đầu 3' của nó tại vị trí khởi đầu quá trình phiên mã và kéo dài ngược chiều (hướng 5') đến khi đủ để tạo ra một lượng gốc bazơ hoặc thành phần tối thiểu cần thiết để khởi động quá trình phiên mã ở các mức có thể phát hiện thấy trên mức nền. Trong các trình tự khởi đầu có thể tìm thấy được vị trí khởi đầu phiên mã (được xác định dễ dàng bằng cách lập bản đồ sử dụng nucleaza S1), cũng như các miền liên kết của protein (các trình tự phổ biến) chịu trách nhiệm liên kết với enzym ARN polymeraza. Các trình tự khởi đầu trong tế bào nhân chuẩn thường, nhưng không bắt buộc, chứa các hộp "TATA" và các hộp "CAT". Các trình tự khởi đầu của tế bào tiền nhân chứa các trình tự Shine Dalgarno ngoài các trình tự phổ biến -10 và -35.

"Trình tự kiểm soát sự biểu hiện" là trình tự ADN mà kiểm soát và điều hòa quá trình phiên mã và quá trình dịch mã trình tự AND khác. Trình tự mã hóa là các trình tự kiểm soát quá trình phiên mã và dịch mã "được kiểm soát" trong tế bào khi enzym

ARN polymeraza phiên mã trình tự mã hóa thành ARN thông tin, sau đó được dịch mã thành protein được mã hóa bởi trình tự mã hóa.

"Trình tự tín hiệu" có thể nằm trước trình tự mã hóa. Trình tự này mã hóa peptit tín hiệu, đầu N của polypeptit, mà thông tin đến tế bào vật chủ để định hướng cho polypeptit này gắn vào bề mặt tế bào hoặc tiết polypeptit vào trong môi trường, và peptit tín hiệu này rời khỏi tế bào vật chủ trước khi protein này rời khỏi tế bào. Các trình tự tín hiệu có thể tìm thấy được ở dạng kết hợp với rất nhiều protein có trong các tế bào tiền nhân và các tế bào nhân chuẩn.

Thuật ngữ "oligonucleotit" chỉ đoạn dò được bộc lộ theo sáng chế, được xác định là một phân tử được cấu thành từ hai hoặc nhiều ribonucleotit, tốt hơn, nếu nhiều hơn ba. Kích thước chính xác của các oligonucleotit phụ thuộc vào nhiều yếu tố, mà theo cách khác phụ thuộc vào chức năng cuối cùng và việc sử oligonucleotit này.

Thuật ngữ "đoạn mồi" theo sáng chế chỉ một oligonucleotit, bất kể nó xuất hiện tự nhiên cũng như ở dạng sản phẩm của quá trình phân cắt bằng enzym giới hạn được tinh chế hoặc được tạo ra bằng cách tổng hợp, mà có khả năng tác động như điểm khởi đầu quá trình tổng hợp khi ở trong điều kiện mà tạo ra việc tổng hợp sản phẩm kéo dài đoạn mồi, mà bổ trợ với mạch axit nucleic, nghĩa là, khi có mặt các nucleotit và yếu tố kích thích như enzym DNA polymeraza và tại nhiệt độ và pH thích hợp. Đoạn mồi có thể ở dạng mạch đơn hoặc mạch kép và phải đủ dài để khởi động quá trình tổng hợp sản phẩm kéo dài mong muốn khi có mặt chất kích thích. Chiều dài chính xác của đoạn mồi phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm nhiệt độ, nguồn cung cấp đoạn mồi và phương pháp sử dụng. Ví dụ, đối với các ứng dụng chẩn đoán, tùy thuộc vào tính phức tạp của trình tự đích, đoạn oligonucleotit mồi thường chứa từ 15 đến 25 nucleotit hoặc nhiều hơn, tuy nhiên nó có thể chứa một lượng nucleotit ít hơn.

Các đoạn mồi theo sáng chế được chọn "về cơ bản" bổ trợ với các mạch khác nhau của trình tự ADN đích cụ thể. Điều đó có nghĩa là các đoạn mồi phải đủ tính bổ trợ để lai với các mạch tương ứng của chúng. Do đó, trình tự đoạn mồi không phản ánh trình tự chính xác của khuôn. Ví dụ, mảnh nucleotit không bổ trợ có thể được gắn vào đầu 5' của đoạn mồi với phần còn lại của trình tự mồi được bổ trợ với mạch đó. Theo cách khác, các bazơ không bổ trợ hoặc các trình tự dài hơn có thể được chèn rải

rác vào trong trình tự mồi, với điều kiện trình tự mồi phải đủ tính bổ trợ để lai với trình tự của mạch và nhờ đó, tạo ra khuôn để tổng hợp sản phẩm kéo dài.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "các endonucleaza giới hạn" và "các enzym giới hạn" chỉ các enzym của vi khuẩn, các enzym này phân cắt ADN mạch kép tại hoặc gần trình tự nucleotit đặc hiệu.

Tế bào được "biến nạp" bằng ADN ngoại sinh hoặc khác loài khi ADN này đã được đưa vào trong tế bào. ADN biến nạp này có thể hoặc không thể hòa nhập (liên kết đồng hóa trị) vào trong ADN nhiễm sắc thể để tạo thành hệ gen của tế bào. Trong các tế bào tiền nhân, tế bào nấm men, và tế bào động vật có vú, ví dụ, ADN biến nạp có thể được giữ trên yếu tố thuộc thể bổ sung như plasmit. Đối với các tế bào nhân chuẩn, tế bào được biến nạp ổn định là tế bào mà trong đó ADN biến nạp hòa nhập được vào nhiễm sắc thể để di truyền cho thế hệ sau của tế bào đó thông qua quá trình sao chép nhiễm sắc thể. Tính ổn định này được chứng minh bằng khả năng của tế bào nhân chuẩn trong việc thiết lập các dòng tế bào hoặc các dòng cấu thành từ quần thể các tế bào con chứa ADN biến nạp. "Dòng" là một quần thể tế bào thu được từ một tế bào hoặc tổ tiên chung bằng quá trình gián phân. “Dòng tế bào" là dòng tế bào ban đầu có khả năng phát triển ổn định *in vitro* trong nhiều thế hệ.

Hai trình tự ADN "gần như tương đồng" khi ít nhất có mức độ tương đồng về trình tự nucleotit khoảng 75% (tốt hơn, nếu ít nhất khoảng 80%, và tốt nhất, nếu ít nhất khoảng 90 hoặc 95%) trên tổng chiều dài xác định của trình tự ADN đó. Các trình tự gần như tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh trình tự sử dụng phần mềm chuẩn có trong ngân hàng dữ liệu trình tự, hoặc trong thử nghiệm lai Southern trong điều kiện, ví dụ, lai nghiêm ngặt, được sử dụng cho hệ thống cụ thể đó. Việc xác định các điều kiện lai thích hợp có thể xác định được bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: Maniatis et al., nêu trên; DNA Cloning, Vols. I & II, nêu trên; Axit nucleic Hybridization, nêu trên.

Cần hiểu rằng, sáng chế cũng mô tả các trình tự ADN mã hóa các phần tử liên kết đặc hiệu (các kháng thể) theo sáng chế mà chúng mã hóa cho các kháng thể có trình tự đã được mô tả mà khi thoái hóa tạo thành các trình tự này. Thuật ngữ “thoái hóa" có nghĩa codon ba ký tự khác nhau được sử dụng để chỉ một axit amin cụ thể.

Cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng các codon sau đây có thể được sử dụng thay thế cho nhau để mã hóa từng axit amin cụ thể:

Phenylalanin (Phe hoặc F)	UUU hoặc UUC
Leuxin (Leu hoặc L)	UUA hoặc UUG hoặc CUU hoặc CUC hoặc CUA hoặc CUG
Isoleuxin (He hoặc I)	AUU hoặc AUC hoặc AUA
Metionin (Met hoặc M)	AUG
Valin (Valor V)	GUU hoặc GUC of GUA hoặc GUG
Serin (Ser hoặc S)	UCU hoặc UCC hoặc UCA hoặc UCG hoặc AGU hoặc AGC
Prolin (Pro hoặc P)	CCU hoặc CCC hoặc CCA hoặc CCG
Threonin (Thr hoặc T)	ACU hoặc ACC hoặc ACA hoặc ACG
Alanin (Ala hoặc A)	GCU hoặc GCG hoặc GCA hoặc GCG
Tyrosin (Tyr hoặc Y)	UAU hoặc UAC
Histidin (His hoặc H)	CAU hoặc CAC
Glutamin (Gln hoặc Q)	CAA hoặc CAG
Asparagin (Asn hoặc N)	AAU hoặc AAC
Lysin (Lys hoặc K)	AAA hoặc AAG
Axit aspartic (Asp hoặc D)	GAU hoặc GAC
Axit glutamic (Glu hoặc E)	GAA hoặc GAG
Xystein (Cys hoặc C)	UGU hoặc UGC
Arginin (Arg hoặc R)	CGU hoặc CGC hoặc CGA hoặc CGG hoặc AGA hoặc AGG
Glyxin (Gly hoặc G)	GGU hoặc GGC hoặc GGA hoặc GGG
Tryptophan (Trp hoặc W)	UGG
Codon kết thúc	UAA (màu nâu vàng nhạt) hoặc UAG (màu hổ phách) hoặc UGA (màu mắt mèo)

Cần hiểu rằng các codon được nêu cụ thể ở trên là sử dụng cho các trình tự ARN. Các codon tương ứng cho ADN mà U được thay thế bằng T.

Các đột biến có thể được tạo ra trong, ví dụ, các trình tự được mô tả của các kháng thể theo sáng chế, mà trong đó codon cụ thể được cải biến thành codon mã hóa axit amin khác. Đột biến này thường được tạo ra bằng cách gây ra sự thay đổi ít nhất có thể đối với các nucleotit. Đột biến thay thế loại này có thể được tạo ra để thay đổi

axit amin trong protein thu được theo cách không được bảo toàn (nghĩa là, bằng cách thay đổi codon từ axit amin thuộc nhóm các axit amin có kích thước cụ thể hoặc phân tích đặc tính của axit amin thuộc nhóm khác) hoặc theo cách bảo toàn (nghĩa là, bằng cách thay đổi codon của axit amin thuộc nhóm các axit amin có amin có kích thước cụ thể hoặc phân tích đặc tính của axit amin cùng nhóm). Sự thay đổi có bảo toàn thường dẫn đến sự thay đổi rất ít trong cấu trúc và chức năng của protein thu được. Sự thay đổi không bảo toàn chắc chắn làm thay đổi cấu trúc, hoạt tính hoặc chức năng của protein thu được. Theo đó, sáng chế cần phải được xem là bao gồm các trình tự có các thay đổi bảo toàn, nhưng không làm thay đổi đáng kể hoạt tính và đặc tính liên kết của protein thu được.

Dưới đây là một ví dụ về các nhóm axit amin khác nhau:

+ Các axit amin có các nhóm R không phân cực:

Alanin, Valin, Leuxin, Isoleuxin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan, Methionin

+ Các axit amin có các nhóm R phân cực không mang điện:

Glyxin, Serin, Threonin, Xystein, Tyrosin, Asparagin, Glutamin

+ Các axit amin có các nhóm R phân cực mang điện (mang điện âm ở pH=6,0):

Axit aspartic, Axit glutamic

+ Các axit amin cơ bản (mang điện dương ở pH=6,0):

Lysin, Arginin, Histidin (ở pH=6,0)

Một nhóm khác có thể kể đến là nhóm các axit amin có các nhóm phenyl:

Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin

Một nhóm khác có thể được phân chia theo trọng lượng phân tử *(nghĩa là,* kích thước của các nhóm R):

Glyxin	75
Alanin	89
Serin	105
Prolin	115
Valin	117
Threonin	119

Xystein	121
Leuxin	131
Isoleuxin	131
Asparagin	132
Aspartic	133
Glutamin	146
Lysin	146
Axit glutamic	147
Metionin	149
Histidin (ở độ pH=6,0)	155
PhenylAlanin	165
Arginin	174
Tyrosin	181
Tryptophan	204

Các thay thế được ưu tiên đặc biệt là:

- Lys thay cho Arg và ngược lại sao cho duy trì được điện tích dương;

- Glu thay cho Asp và ngược lại sao cho duy trì được điện tích âm;

- Ser thay cho Thr sao cho duy trì được gốc -OH tự do; và

- Gln thay cho Asn sao cho duy trì được gốc NH_2 tự do.

Các thay thế axit amin có thể cũng được đưa vào để thay thế axit amin có đặc tính cụ thể được ưu tiên hơn. Ví dụ, Cys có thể được đưa vào vị trí có khả năng tạo cầu disulfua với Cys khác. His có thể được đưa vào dưới dạng vị trí "xúc tác" đặc biệt (nghĩa là, His có thể tác động như một axit hoặc bazơ và là axit amin phổ biến trong xúc tác sinh hóa). Pro có thể được đưa vào do cấu trúc phẳng đặc biệt của nó, mà có thể tạo ra (cấu trúc ba chiều của protein).

Hai trình tự axit amin "gần như tương đồng" khi ít nhất khoảng 70% gốc axit amin (tốt hơn, nếu ít nhất khoảng 80%, và tốt nhất, nếu ít nhất khoảng 90 hoặc 95%) giống nhau, hoặc là các thay thế bảo toàn.

Vùng "khác loài" của cấu trúc ADN là mảnh ADN có thể xác định được nằm trong phân tử ADN lớn hơn, nhưng không được phát hiện thấy ở trạng thái kết hợp với

phân tử lớn hơn trong tự nhiên. Do đó, khi vùng khác loài mã hóa gen của động vật có vú, gen này thường kẹp sườn bởi ADN mà không kẹp sườn AND hệ gen của động vật có vú trong hệ gen của sinh vật nguồn. Một ví dụ khác về trình tự mã hóa khác loài là cấu trúc trong đó bản thân trình tự mã hóa không có trong tự nhiên (ví dụ, ADN bổ trợ trong đó các trình tự mã hóa chứa các intron, hoặc các trình tự tổng hợp có các codon khác với gen tự nhiên). Các biến thể alen hoặc các đột biến xuất hiện trong tự nhiên không tạo ra vùng khác loài cho ADN theo sáng chế.

Cụm từ "dược dụng" chỉ các thực thể phân tử và các thành phần có khả năng được dung nạp sinh lý và thường không tạo ra phản ứng dị ứng hoặc phản ứng không mong muốn tương tự như rối loạn tiêu hóa, hoa mắt chóng mặt và các biểu hiện tương tự khác khi được dùng cho người.

Cụm từ "lượng hiệu quả điều trị" theo sáng chế chỉ lượng đủ để ngăn ngừa và tốt hơn, nếu làm giảm ít nhất trong lâm sàng khoảng 30%, tốt hơn là ít nhất 50%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90%, trong sự phát triển hoặc tiến triển hoặc hoạt tính phân bào của khối tế bào đích, nhóm các tế bào ung thư hoặc u, hoặc đặc tính bệnh lý khác. Ví dụ, mức hoạt hóa hoặc hoạt tính của EGFR hoặc lượng hoặc số lượng các tế bào dương tính với EGFR, nhất là các tế bào phản ứng hoặc dương tính với kháng thể hoặc phần tử liên kết có thể được tạo ra.

Trình tự ADN "được liên kết một cách có kiểm soát" với trình tự kiểm soát sự biểu hiện khi trình tự kiểm soát sự biểu hiện này kiểm soát và điều hòa quá trình phiên mã và quá trình dịch mã của trình tự AND đó. Thuật ngữ "được liên kết một cách có kiểm soát" bao gồm cả tín hiệu khởi đầu thích hợp (ví dụ, ATG) phía trước trình tự ADN được biểu hiện và giữ khung đọc mở chính xác cho phép biểu hiện trình tự ADN dưới sự kiểm soát của trình tự kiểm soát sự biểu hiện và quá trình tạo ra sản phẩm mong muốn được mã hóa bởi trình tự ADN đó. Nếu muốn chèn một gen vào phân tử ADN tái tổ hợp không chứa tín hiệu khởi đầu thích hợp, thì có thể chèn tín hiệu khởi đầu này vào phía trước gen đó.

Thuật ngữ "điều kiện lai chuẩn" chỉ các điều kiện muối và nhiệt độ gần tương đương với 5 x SSC và 65°C đối với cả quá trình lai hoặc rửa. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng "điều kiện lai chuẩn" này phụ thuộc vào các điều kiện cụ thể bao gồm nồng độ natri và magiê trong dung dịch đệm,

chiều dài trình tự nucleotit và nồng độ, tỷ lệ bắt cặp sai, tỷ lệ formamit, và các yếu tố tương tự khác. Tương tự, điều quan trọng khi xác định "điều kiện lai chuẩn" là loại trình tự lai dạng ARN-ARN, ADN-ADN hay ARN-ADN. "Điều kiện lai chuẩn" này được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng xác định được theo các công thức đã biết, trong đó quá trình lai thường diễn ra ở nhiệt độ 10-20°C dưới Tm được dự báo hoặc được xác định trước kèm theo các lần rửa trong điều kiện nghiêm ngặt hơn nếu muốn.

Sáng chế đề xuất phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là kháng thể hoặc mảnh của nó, nhận biết epitop EGFR được phát hiện trong các tế bào sinh u, siêu tăng sinh hoặc bất thường trong đó epitop được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường và không thể phát hiện trong tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại. Cụ thể, nhưng không phải là phương án giới hạn, phần tử liên kết, nghĩa là kháng thể, nhận biết epitop EGFR được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến hydratcacbon đơn giản hoặc glycosyl hóa sớm và được tăng hoặc giảm khi có sự cải biến carbohydrat phức hoặc glycosyl hóa. Phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là kháng thể này hoặc mảnh của nó, không liên kết đặc hiệu với hoặc nhận biết bình thường hoặc tế bào kiểu dại chứa epitop EGFR kiểu dại hoặc bình thường khi EGFR cải biến sau dịch mã có mặt được biểu hiện quá mức hoặc bình thường.

Sáng chế còn đề cập đến các kháng thể 806, 175, 124, 1133, ch806 và hu806 và các mảnh của chúng, bao gồm các mảnh sinh miễn dịch, nhận biết epitop EGFR, cụ thể là EGFR peptit ($_{287}$CGADSYEMEEDGVRKC$_{302}$ (SEQ ID NO:14)), được biểu hiện trong các tế bào sinh u, siêu tăng sinh hoặc bất thường, trong đó epitop được tăng cường, biểu hiện, hoặc phát hiện được mà không thể phát hiện được trong tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại. Theo một ví dụ cụ thể, nhưng không phải là phương án giới hạn, kháng thể này nhận biết epitop EGFR được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến hydratcacbon đơn giản hoặc glycosyl hóa sớm và được làm giảm hoặc không tăng khi xuất hiện cải biến carbohydrat phức hoặc glycosyl hóa. Kháng thể nêu trên hoặc mảnh của nó không liên kết đặc hiệu hoặc nhận biết các tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại chứa epitop EGFR bình thường hoặc kiểu dại khi có mặt sự biểu hiện quá mức, sự khuếch đại, hoặc sự kiện sinh u.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế và như được nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra các kháng thể đơn dòng 806, 175, 124, 1133, ch806 và hu806 nhận biết đặc hiệu sự khuếch đại EGFR kiểu dại và d2-7 EGFR, nhưng liên kết đặc hiệu với epitop khác với peptit tiếp hợp đồng nhất của đột biến de2-EGFR. Ngoài ra, trong khi mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806 không nhận biết EGFR bình thường, kiểu dại được biểu hiện trên bề mặt tế bào của u thần kinh đệm các tế bào, thì chúng lại liên kết đặc hiệu với vùng ngoại bào của EGFR được cố định trên bề mặt của các đĩa ELISA, điều này cho thấy epitop có bề ngoài giống polypeptit.

Quan trọng là, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, ch806 và hu806 không liên kết đáng kể với các mô bình thường như gan và da, mà biểu hiện các mức wtEGFR nội sinh cao hơn so với hầu hết các mô bình thường khác, nhưng trong đó EGFR không được biểu hiện quá mức hoặc được khuếch đại. Do đó, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806 thể hiện tính đặc hiệu mới và hữu dụng để nhận biết de2-7 EGFR và sự khuếch đại EGFR, đồng thời không nhận biết EGFR bình thường, kiểu dại hoặc peptit nối đặc trưng, đặc trưng cho de2-7 EGFR. Theo một ví dụ được ưu tiên, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806 theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin vùng CDR của chuỗi nặng VH và VL lần lượt được mô tả trên các Fig.14B và 15B; 74B và 75B; 51B và 51D; 52B và 52D; và 55A và 55B (SEQ ID NOS:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và 42 và 47; SEQ ID NO:42 lần lượt bao gồm peptit tín hiệu của chuỗi nặng VH của hu806 và các chuỗi VH có trình tự SEQ ID NOS:163 và 164, và SEQ ID NO:47 lần lượt bao gồm peptit tín hiệu của chuỗi nhẹ VL của hu806 và các trình tự của chuỗi nhẹ VL SEQ ID NOS: 165 và 166).

Theo một ví dụ khác, sáng chế đề xuất kháng thể có khả năng cạnh tranh với kháng thể 175, trong điều kiện trong đó có ít nhất 10% kháng thể có trình tự chuỗi VH và VL của kháng thể 175 (SEQ ID NOS:129 và 134, tương ứng) bị phong bế không liên kết với de2-7EGFR bằng cách cạnh tranh với kháng thể này trong thử nghiệm ELISA. Như đã nêu ở trên, các kháng thể kháng idiotyp cũng được dự tính thuộc phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến các phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh của chúng, nhận biết epitop EGFR có mặt trong các tế bào có sự khuếch đại EGFR hoặc biểu hiện d2-7 EGFR và không thể phát hiện trong các tế bào biểu hiện

EGFR bình thường hoặc kiểu dại, cụ thể là khi có mặt sự cải biến bình thường sau dịch mã.

Cần lưu ý sáng chế đã chỉ rõ rằng các quan sát không giới hạn khác hoặc đặc tính khác của kháng thể theo sáng chế là khả năng nhận biết của chúng đối với epitop của chúng khi có nhiều nhóm nhóm manoza, đây là đặc trưng của quá trình glycosyl sớm hoặc cải biến hydratcacbon đơn giản. Do đó, việc glycosyl hóa thay đổi hoặc bất thường tạo điều kiện cho sự có mặt và/hoặc nhận diện epitop của kháng thể hoặc chứa phần epitop của kháng thể đó.

Glycosyl hóa thuộc và bao gồm cải biến sau dịch mã của các protein, gọi là các glycoprotein, bằng cách bổ sung các oligosacarit. Các oligosacarit được bổ sung vào các vị trí glycosyl hóa trong các glycoprotein, cụ thể là bao gồm các oligosacarit được liên kết tại vị trí N và các oligosacarit được liên kết tại vị trí O. các oligosacarit được liên kết tại vị trí N được bổ sung vào gốc Asn, cụ thể là gốc Asn nằm trong trình tự N-X-S/T, trong đó X không thể là Pro hoặc Asp, và không phải là các gốc phổ biến nhất được tìm thấy trong các glycoprotein. Trong quá trình sinh tổng hợp các glycoprotein được liên kết tại vị trí N, oligosacarit loại có manoza hàm lượng cao (thường bao gồm dolichol, N-Axetylglucosamin, manoza và glucoza được tạo thành đầu tiên trong mô lưới nội chất (endoplasmic reticulum - ER). Các glycoprotein loại có hàm lượng manoza cao sau đó được vận chuyển từ ER vào Golgi, tại đây việc xử lý và cải biến các oligosacarit tiếp tục diễn ra. Các oligosacarit được liên kết tại vị trí O được bổ sung vào nhóm hydroxyl của các gốc Ser hoặc Thr. Trong các oligosacarit được liên kết ở vị trí O, N-Axetylglucosamin đầu tiên được vận chuyển đến gốc Ser hoặc Thr bằng enzym N-Axetylglucosaminyltransferaza trong ER. Sau đó, protein này di chuyển đến Golgi tại đây chúng được cải biến và kéo dài mạch.

Trong một ví dụ cụ thể theo sáng chế và như đã được công bố ở trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra các kháng thể đơn dòng, ví dụ, các kháng thể được ký hiệu là mAb806 (và dạng khảm của nó ch806), mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806 nhận biết đặc hiệu sự khuếch đại EGFR kiểu dại và d2-7 EGFR, nhưng liên kết đặc hiệu với epitop khác với peptit tiếp hợp đồng nhất của đột biến de2-EGFR. Các kháng thể theo sáng chế nhận biết đặc hiệu EGFR được biểu hiện quá mức, bao gồm sự khuếch đại EGFR và EGFR đột biến (ví dụ là bằng đột biến de2-7), cụ thể là khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường. Ngoài ra, các kháng thể này không nhận biết EGFR bình

thường, kiểu dại được biểu hiện trên bề mặt tế bào của các tế bào u thần kinh đệm, đồng thời chúng liên kết đặc hiệu với vùng ngoại bào của EGFR được cố định trên bề mặt của các đĩa ELISA, điều này cho thấy epitop cấu hình có bề ngoài giống polypeptit. Quan trọng là, các kháng thể này không liên kết đáng kể với các mô thông thường như gan và da, mà biểu hiện các mức wtEGFR nội sinh cao hơn hầu hết các mô thông thường khác, nhưng ở đây EGFR không được biểu hiện quá mức hoặc được khuếch đại. Do đó, các kháng thể này thể hiện tính đặc hiệu mới và hữu dụng, nhận biết de2-7 EGFR và sự khuếch đại EGFR, đồng thời không nhận biết EGFR bình thường, kiểu dại hoặc peptit nối đặc trưng của de2-7 EGFR.

Theo một trường hợp được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế là các kháng thể có các đặc trưng của kháng thể được các tác giả sáng chế xác định và phân tích đặc tính, cụ thể là nhận biết được sự khuếch đại EGFR và de2-7EGFR. Theo một trường hợp được đặc biệt ưu tiên, các kháng thể nêu trên là mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806 hoặc các mảnh có hoạt tính của chúng. Theo một ví dụ được ưu tiên khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin của chuỗi VH và VL được mô tả trong các Fig.16 và 17; 74B và 75B; 51B và 51D; 52B và 52D; và 55A và 55B, tương ứng.

Tốt hơn, nếu epitop của phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là kháng thể nằm trong vùng bao gồm các gốc 273-501 của trình tự EGFR trưởng thành, bình thường hoặc kiểu dại, và tốt hơn, nếu epitop bao gồm các gốc 287-302 của trình tự EGFR trưởng thành, bình thường hoặc kiểu dại (SEQ ID NO:14). Do đó, cũng được đề xuất là các protein liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể, liên kết đặc hiệu với d2-7 EGFR tại epitop nằm trong vùng bao gồm các gốc 273-501 của trình tự EGFR, và bao gồm các gốc 287-302 của trình tự EGFR (SEQ ID NO:14). Epitop này có thể được xác định bằng các kỹ thuật lập bản đồ epitop thông thường bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo cách khác, các trình tự ADN mã hóa các gốc 273-501 và 287-302 (SEQ ID NO:14) có thể được phân cắt, và các mảnh thu được được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Liên kết của kháng thể có thể được xác định như nêu trên.

Cụ thể, phần tử nêu trên sẽ liên kết đặc hiệu với epitop bao gồm các gốc 273-501, và cụ thể hơn là bao gồm các gốc 287-302 (SEQ ID NO:14), của trình tự EGFR trưởng thành, bình thường hoặc kiểu dại. Tuy nhiên, các kháng thể khác sẽ có mô hình phản

ứng giống hoặc gần giống cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Việc này có thể được xác định bằng cách so sánh các phần tử này với kháng thể chứa trình tự của các miền thuộc chuỗi VH và VL nêu trong SEQ ID NO:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và 42 và 47, tương ứng. Việc so sánh thường được tiến hành bằng cách sử dụng phân tích thẩm tách Western, trong đó các phần tử liên kết được cho liên kết với hai vết được chuẩn bị từ chế phẩm nhân của tế bào sao cho có thể so sánh trực tiếp được mô hình liên kết đó.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất kháng thể có khả năng cạnh tranh với mAb806 trong các điều kiện trong đó ít nhất 10% kháng thể có trình tự chuỗi VH và VL của một trong số các kháng thể này bị phong bế không liên kết với de2-7EGFR bằng cách cạnh tranh với kháng thể này trong thử nghiệm ELISA. Như nêu trên, các kháng thể kháng idiotyp cũng được tính đến và được minh họa theo sáng chế.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất kháng thể có khả năng cạnh tranh với mAb175, mAb124, và/hoặc mAb1133 trong điều kiện mà trong đó ít nhất 10% kháng thể có trình tự chuỗi VH và VL của một trong số các kháng thể này bị phong bế không liên kết với de2-7EGFR bằng cách cạnh tranh với kháng thể này trong thử nghiệm ELISA. Như đã nêu ở trên, các kháng thể kháng genotyp cũng được tính đến và được minh họa ở đây.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề xuất kháng thể có khả năng cạnh tranh với mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và/hoặc hu806, trong các điều kiện trong đó ít nhất 10% kháng thể có trình tự chuỗi VH và VL của một trong số các kháng thể này bị phong bế không liên kết với de2-7EGFR bằng cách cạnh tranh với kháng thể này trong thử nghiệm ELISA. Như đã nêu ở trên, các kháng thể kháng genotyp cũng được tính đến và được minh họa theo sáng chế.

Polypeptit được tách chủ yếu cấu tạo từ epitop bao gồm các gốc 273-501 và cụ thể hơn là bao gồm các gốc 287-302 (SEQ ID NO:14) của EGFR kiểu dại trưởng thành cũng là một trường hợp khác của bản mô tả. Peptit theo sáng chế đặc biệt hữu dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán hoặc trong các kit và trong điều trị hoặc phòng ngừa, bao gồm dưới dạng vacxin kháng u hoặc chống ung thư. Do đó, các sản phẩm chứa peptit theo sáng chế bao gồm dược phẩm và chế phẩm sinh miễn dịch.

Sử dụng trong chẩn đoán và điều trị

Nhờ tính đặc hiệu đặc trưng của các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh của chúng, nên (các) phần tử liên kết này nhận biết epitop EGFR được phát hiện thấy trong các tế bào sinh u, siêu tăng sinh hoặc bất thường và không thể phát hiện trong các tế bào bình thường hoặc tế bào kiểu dại và trong đó epitop được tăng cường hoặc được cải thiện khi cải biến sau dịch mã một cách bất thường và trong đó (các) phần tử liên kết đặc hiệu với d2-7 EGFR và EGFR được khuếch đại, nhưng không liên kết đặc hiệu với wtEGFR, tạo ra tính hữu dụng để chẩn đoán và điều trị để xác định, phân tích đặc tính, tạo đích và điều trị, làm giảm hoặc loại bỏ một số loại tế bào sinh u và loại u, ví dụ u đầu và cổ, vú, phổi, bàng quang hoặc tuyến tiền liệt và u thần kinh đệm, mà không gây ra các vấn đề thường xuất hiện trong quá trình hấp thu của mô bình thường có thể gặp phải đối với kháng thể EGFR đã biết trước đó. Do đó, các tế bào biểu hiện quá mức EGFR (ví dụ, bằng cách khuếch đại hoặc biểu hiện thể đột biến hoặc biến thể của EGFR), cụ thể là các tế bào có cải biến sau dịch mã một cách bất thường có thể được nhận biết, phân lập, phân tích đặc tính, tạo đích và xử lý hoặc loại bỏ sử dụng (các) phần tử liên kết, nghĩa là (các) kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng.

Theo một trường hợp khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị u, tình trạng ung thư, tình trạng bệnh tiền ung thư, và tình trạng bệnh lý bất kỳ liên quan đến hoặc là kết quả của sự tăng sinh tế bào bao gồm việc sử dụng mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và/hoặc hu806.

Do đó, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng để phân loại theo bản chất của các khối u liên quan đến EGFR hoặc các tế bào sinh u, bằng cách nhuộm màu hoặc nhận biết nếu các khối u này hoặc các tế bào mà trong đó EGFR được biểu hiện quá mức, cụ thể là có sự khuếch đại EGFR và/hoặc đột biến EGFR, cụ thể là de2-7EGFR. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế biểu hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* đáng kể đối với các khối u có sự khuếch đại EGFR và các mảnh ghép khác loài dương tính với de2-7 EGFR.

Như đã nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế nhận biết các dạng EGFR đi kèm với khối u (de2-7 EGFR và EGFR được khuếch đại) không phải là thụ thể bình thường, kiểu dại khi được biểu hiện trong các tế bào bình thường. Được cho rằng việc nhận biết của kháng thể này phụ thuộc vào sự cải biến sau dịch mã một cách bất thường (ví dụ, biến thể glycosyl

hóa, axetyl hoặc phosphoryl hóa đặc trưng) EGFR được biểu hiện trong các tế bào thể hiện sự biểu hiện quá mức gen EGFR.

Như được đề cập ở trên, kháng thể theo sáng chế được sử dụng trong các nghiên cứu trị liệu và cho thấy tác dụng ức chế sự phát triển của các mảnh ghép khác loài biểu hiện quá mức EGFR (ví dụ, được khuếch đại) và các mảnh ghép khác loài của các khối u ở người biểu hiện de2-7 EGFR ở người và tạo ra sự hoại tử đáng kể trong các khối u này.

Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế ức chế sự phát triển các khối u trong não trong mô hình thử nghiệm tác dụng ngăn ngừa. Mô hình này bao gồm bước tiêm các tế bào u thần kinh đệm biểu hiện de2-7 EGFR vào chuột trụi lông và sau đó, kháng thể được tiêm vào trong não trong cùng ngày hoặc trong vòng từ 1 đến 3 ngày, tùy ý, với các liều nhắc lại. Liều kháng thể thích hợp là khoảng 10 μg. Chuột được tiêm kháng thể được so sánh với đối chứng, và đã phát hiện thấy sự sống sót của những con chuột được tiêm kháng thể tăng lên đáng kể.

Do đó, theo một trường hợp khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị khối u, tình trạng bệnh ung thư, tình trạng bệnh tiền ung thư, và tình trạng bệnh lý bất kỳ liên quan đến hoặc là kết quả của sự tăng sinh tế bào bao gồm việc dùng phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế.

Các kháng thể theo sáng chế được thiết kế để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán và điều trị các khối u ở đối tượng là người hoặc động vật, cụ thể là các khối u biểu mô. Các khối u này có thể là các khối u rắn khởi phát hoặc thứ phát thuộc loại bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, u thần kinh đệm, vú, phổi, tuyến tiền liệt, đầu hoặc cổ.

Tạo ra phần tử liên kết và kháng thể

Phương pháp thông thường để tạo ra kháng thể đơn dòng bằng tế bào lai là đã biết. Các dòng tế bào bất tử tạo ra kháng thể cũng có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác kỹ thuật dung hợp như biến nạp trực tiếp lympho bào B bằng ADN gây ung thư (oncogen ADN), hoặc gây nhiễm bằng virut Epstein-Barr. Ví dụ, xem tài liệu: M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammering et al., "Monoclonal Antibodies And T cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies"

(1980); cũng xem: US 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; và 4,493,890.

Danh sách (bảng) các kháng thể đơn dòng được tạo ra kháng EFGR có thể được sàng lọc theo các đặc tính khác nhau; nghĩa là, isotyp, epitop, ái lực, v.v... Một trong các mối quan tâm đặc biệt là các kháng thể đơn dòng mô phỏng hoạt tính của EFGR hoặc các tiểu đơn vị của nó. Các kháng thể đơn dòng này có thể được xác định dễ dàng trong các thử nghiệm hoạt tính của phần tử liên kết đặc hiệu. Các kháng thể có ái lực cao cũng hữu dụng khi có thể tiến hành tinh chế phần tử liên kết đặc hiệu ở dạng tự nhiên hoặc tái tổ hợp theo ái lực miễn dịch.

Các phương pháp tạo kháng thể kháng EFGR đa dòng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem US 4,493,795 của Nestor và đồng tác giả. Kháng thể đơn dòng, thường chứa phần Fab và/hoặc F (ab') 2 của các phân tử kháng thể hữu dụng, có thể được chuẩn bị sử dụng công nghệ lai được mô tả trong tài liệu: Antibodies-A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988). Tóm tắt như sau: để tạo ra tế bào lai mà tạo ra kháng thể đơn dòng, tế bào tủy hoặc dòng tế bào tự sản sinh khác được cho dung hợp với các tế bào lympho thu được từ lá lách của động vật có vú gây miễn dịch quá mức bằng EGFR thích hợp.

Các tế bào lá lách thường được dung hợp với các tế bào tủy bằng cách sử dụng polyetylen glycol (PEG) 6000. Các thể lai sau khi dung hợp này được chọn theo tính nhạy của chúng với HAT. Các tế bào lai tạo ra kháng thể đơn dòng hữu dụng trong thực hành sáng chế được xác định theo khả khả năng phản ứng miễn dịch của chúng với kháng thể hoặc phần tử liên kết theo sáng chế và khả năng ức chế hoạt tính sinh u hoặc tăng sinh đặc hiệu của chúng trong các tế bào đích.

Kháng thể đơn dòng hữu dụng trong thực hành sáng chế có thể được tạo ra bằng cách kích khởi môi trường nuôi cấy tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng bao gồm môi trường dinh dưỡng chứa tế bào lai tiết ra các phân tử kháng thể có tính đặc hiệu kháng nguyên thích hợp. Môi trường nuôi cấy được giữ trong các điều kiện và trong một khoảng thời gian đủ để cho tế bào lai tiết các phân tử kháng thể này vào môi trường. Môi trường chứa kháng thể sau đó được thu gom. Sau đó, các phân tử kháng thể này được tách tiếp bằng các kỹ thuật đã biết.

Môi trường được sử dụng để tạo ra các chế phẩm này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể mua được trên thị trường, bao gồm môi trường nuôi cấy tổng hợp, chuột lai cùng dòng và các thành phần khác. Môi trường tổng hợp được lấy làm ví dụ là môi trường thiết yếu tối thiểu Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8:396 (1959)) được bổ sung glucoza 4,5 gm/1, Glutamin 20 mm, và 20% huyết thanh bê. Chủng chuột được lai cùng dòng được lấy làm ví dụ là Balb/c.

Các phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng kháng EGFR cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem tài liệu: Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983). Thông thường, EGFR hoặc peptit tương tự được sử dụng đơn lẻ hoặc dung hợp với chất mang sinh miễn dịch, dưới dạng kháng nguyên theo quy trình đã được mô tả trước đó tạo ra các kháng thể đơn dòng kháng EGFR. Các tế bào lai được sàng lọc theo khả năng tạo ra kháng thể có thể phản ứng miễn dịch với EGFR có mặt trong các tế bào sinh u, bất thường hoặc tăng sinh. Kháng thể kháng EGFR khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể HuMAX-EGFr do Genmab/Medarex cung cấp, kháng thể 108 (ATCC HB9764) và US 6,217,866, và kháng thể 14E1 do Schering AG cung cấp (US 5,942,602).

Các phần tử liên kết ở dạng tái tổ hợp, dạng khảm, đặc hiệu kép và các mảnh của nó

Thông thường, các vùng CDR1, chứa các trình tự axit amin về cơ bản giống với các vùng CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và 42 và 47, tương ứng, sẽ được mang trong một cấu trúc mà cho phép các vùng CDR1 liên kết với kháng nguyên của u. Đối với vùng CDR1 có trình tự SEQ ID NO:4, chẳng hạn, thì tốt hơn, nếu nó được mang bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL có trình tự SEQ ID NO:4 (và tương tự đối với các trình tự được trích dẫn khác).

Thông thường, các vùng CDR2, bao gồm các trình tự axit amin về cơ bản giống như các vùng CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và 42 và 47, tương ứng, sẽ được mang trong một cấu trúc mà cho phép các vùng CDR2 liên kết với kháng nguyên của u. Đối với vùng CDR2 có trình tự SEQ ID NO:4, chẳng hạn, thì tốt hơn, nếu nó được mang bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL có trình tự SEQ ID NO:4 (và tương tự đối với các trình tự được trích dẫn khác).

Thông thường, các vùng CDR3, bao gồm các trình tự axit amin về cơ bản giống như các vùng CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NOS:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27;

32 và 37; và 42 và 47, tương ứng, sẽ được mang trong một cấu trúc mà cho phép các vùng CDR3 liên kết với kháng nguyên của u. Đối với vùng CDR3 có trình tự SEQ ID NO:4, chẳng hạn, thì tốt hơn, nếu nó được mang bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL có trình tự SEQ ID NO:4 (và tương tự đối với các trình tự được trích dẫn khác).

Thuật ngữ "về cơ bản giống như" có nghĩa là các vùng CDR đó, ví dụ các vùng CDR3, được mô tả theo sáng chế sẽ giống hoặc có mức tương đồng cao với các vùng đã được mô tả cụ thể có trình tự SEQ ID NO:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và 42 và 47, tương ứng. Thuật ngữ "có mức tương đồng cao" chỉ trường hợp chỉ có một số ít thay thế, tốt hơn, nếu từ 1 đến 8, tốt hơn, nếu từ 1 đến 5, tốt hơn, nếu từ 1 đến 4, hoặc từ 1 đến 3 hoặc 1 hoặc 2 thay thế có thể được tạo ra trong một hoặc nhiều CDR. Các thuật ngữ này bao gồm trường hợp các CDR bị cắt cụt một đoạn, miễn là kháng thể thu được vẫn biểu hiện các đặc tính đặc trưng của nhóm kháng thể theo sáng chế, như được biểu hiện bởi mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806.

Cấu trúc dùng để mang các CDR theo sáng chế, cụ thể CDR3, thường là trình tự của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc phần cơ bản của nó, trong đó các vùng CDR nằm tại các vị trí mà tương ứng với vị trí của các vùng CDR của thuộc các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể xuất hiện trong tự nhiên được mã hóa bởi các gen globulin miễn dịch được sắp xếp lại. Các cấu trúc và vị trí của các vùng biến đổi của globulin miễn dịch có thể được xác định theo tài liệu: Kabat, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987, và các phiên bản cập nhật của nó, được công bố trên Internet (http://immuno.bme.nwu.edu)). Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng biết rằng, có thể xác định được các CDR bằng nhiều cách. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp phân tích xác định Kabat, Chothia và phương pháp phân tích xác định vùng kết hợp. Liên quan đến vấn đề này xem đường link http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrid.

Các trình tự axit amin gần giống như được nêu cho các vùng CDR của chuỗi VH của các kháng thể theo sáng chế nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng ở người hoặc phần cơ bản của nó, và các trình tự axit amin về cơ bản được giống như các vùng CDR của chuỗi VL của các kháng thể theo sáng chế nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ ở người hoặc phần cơ bản của nó.

Các vùng biến đổi có thể thu được từ vùng biến đổi của kháng thể của tế bào dòng mầm hoặc kháng thể người được sắp xếp lại, hoặc có thể là vùng biến đổi tổng hợp dựa trên các trình tự phổ biến của các vùng biến đổi của kháng thể ở người. Các trình tự thu được từ vùng CDR3 được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ như được xác định ở trên có thể được đưa vào trong danh mục bao gồm các vùng biến đổi thiếu vùng CDR3, bằng cách sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp.

Ví dụ, tài liệu: Marks et al (Bio/Technology, 1992,10:779-783) đã mô tả các phương pháp tạo ra sự đa dạng về tính đặc hiệu các vùng biến đổi của kháng thể, trong đó các đoạn mồi liên ứng định hướng đến hoặc liền kề với đầu 5' của khu vực biến đổi được sử dụng kết hợp với các đoạn mồi liên ứng cho vùng khung làm việc thứ ba của gen VH ở người để tạo ra sự đa dạng về tính đặc hiệu các biến đổi VH thiếu CDR3. Marks và các cộng sự còn mô tả cách thức có thể kết hợp sự đa dạng về tính đặc hiệu nêu trên với vùng CDR3 của một kháng thể cụ thể. Sử dụng các kỹ thuật tương tự, các trình tự thu được từ CDR3 theo sáng chế có thể được sắp xếp lại bằng sự đa dạng về tính đặc hiệu vùng VH hoặc VL thiếu CDR3, và vùng VH hoặc VL sau khi được sắp xếp lại hoàn chỉnh được cho kết hợp với vùng VL hoặc VH cùng bản chất để tạo ra các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế. Sau đó, sự đa dạng về tính đặc hiệu này có thể được biểu hiện trong hệ thống vật chủ thích hợp như hệ thống biểu hiện thể thực khuẩn của WO 92/01047 sao cho có thể chọn được các phần tử liên kết đặc hiệu thích hợp. Một sự đa dạng về tính đặc hiệu có thể bao gồm một số phần tử bất kỳ từ 10^4 phần tử riêng rẽ trở lên, ví dụ từ 10^6 đến 10^8 hoặc 10^{10} phần tử.

Kỹ thuật sắp xếp tương tự hoặc kỹ thuật tổ hợp cũng được Stemmer mô tả (Nature, 1994,370:389-391). Stemmer đã mô tả một kỹ thuật liên quan đến gen p-lactamaza và cho thấy rằng kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể.

Một cách khác để tạo ra các vùng VH hoặc VL mang các trình tự thu được từ vùng bắt nguồn từ CDR3 theo sáng chế là sử dụng đột biến ngẫu nhiên, ví dụ các gen VH hoặc VL của kháng thể mAb806 để tạo ra các đột biến nằm trong toàn bộ vùng biến đổi. Kỹ thuật này được Gram và các cộng sự mô tả (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), người đã sử dụng PCR đột biến ngẫu nhiên (error-prone PCR).

Một phương pháp khác có thể được sử dụng là gây đột biến điểm trực tiếp đối với các vùng CDR của gen VH hoặc VL. Kỹ thuật này được Barbas và các cộng sự mô

tả, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) được Schier và các cộng sự mô tả. (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

Tất cả các kỹ thuật được mô tả ở trên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bản thân những kỹ thuật này không tạo thành một phần của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình có khả năng sử dụng các kỹ thuật này để tạo ra các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế bằng cách sử dụng sử dụng phương pháp chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phần cơ bản của vùng globulin biến đổi miễn dịch bao gồm ít nhất ba vùng CDR, cùng với các vùng khung làm việc xen kẽ của chúng. Tốt hơn, nếu phần này cũng chứa ít nhất khoảng 50% hoặc cả hai vùng khung làm việc thứ nhất và thứ tư, 50% là 50% đầu C của vùng khung làm việc đầu tiên và 50% đầu C của vùng khung làm việc thứ tư. Các gốc khác ở đầu N hoặc đầu C của phần cơ bản vùng của biến đổi có thể là các đầu mà thường không liên quan đến miền biến đổi xuất hiện trong tự nhiên. Ví dụ, cấu trúc của các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể dẫn đến việc đưa vào các gốc ở đầu N hoặc C được mã hóa bởi các liên kết được đưa vào để hỗ trợ bước tách dòng hoặc các bước xử lý khác. Các bước xử lý khác bao gồm đưa các liên kết vào để nối các miền biến đổi theo sáng chế với các trình tự protein khác bao gồm các chuỗi nặng của globulin miễn dịch, các miền biến đổi khác (ví dụ, tạo ra các diabody) hoặc các chất đánh dấu protein như được đề cập cụ thể bên dưới.

Mặc dù theo một trường hợp được ưu tiên theo sáng chế, các phần tử liên kết đặc hiệu bao gồm một cặp miền liên kết dựa trên các trình tự về cơ bản giống như trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và 42 và 47, tương ứng, được ưu tiên, các miền liên kết đơn dựa trên các trình tự này tạo thành các trường hợp khác theo sáng chế. Đối với các miền liên kết dựa trên trình tự về cơ bản giống như các chuỗi VH, các miền liên kết này có thể được sử dụng làm các chất tạo đích cho các kháng nguyên u vì đã biết rằng các miền VH của globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích.

Với các vùng liên kết đặc hiệu của chuỗi đơn, các miền liên kết này có thể được sử dụng để sàng lọc các vùng bổ trợ có khả năng tạo thành phần tử có hai vùng liên kết

đặc hiệu có các đặc tính *in vivo* tốt bằng hoặc tương đương với các kháng thể mAb806, ch806, mAb175, mAb124, mAb1133 và hu806 được mô tả theo sáng chế.

Điều này có thể thu được bằng các phương pháp sàng lọc biểu hiện thể thực khuẩn bằng cách sử dụng phương pháp gọi là tổ hợp kép thứ bậc như được mô tả trong US 5.969.108, trong đó tập hợp cá thể chứa dòng vô tính chuỗi H hoặc L được sử dụng để gây nhiễm một thư viện dòng vô tính hoàn chỉnh mã hóa các chuỗi khác (L hoặc H) và phần tử có hai vùng liên kết đặc hiệu thu được này được chọn theo các kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn như các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu nêu trên. Kỹ thuật này cũng được mô tả trong tài liệu: Marks et al, như trên.

Các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế có thể còn bao gồm các vùng ổn định hoặc phần của chúng. Ví dụ, các phần tử liên kết đặc hiệu dựa trên các trình tự chuỗi VL có thể được gắn vào đầu C của chúng với vùng ổn định của chuỗi nhẹ của kháng thể, kể cả Ck của các chuỗi Cλ ở người, tốt hơn là các chuỗi Cλ. Tương tự, các phần tử liên kết đặc hiệu dựa trên các trình tự chuỗi VH có thể được gắn vào đầu C của chúng với toàn bộ hoặc một phần của chuỗi nặng của globulin miễn dịch thu được từ isotyp kháng thể bất kỳ, ví dụ IgG, IgA, IgE, IgD và IgM và phân nhóm isotyp bất kỳ, cụ thể là IgGl, IgG2b, và IgG4. IgGl là được ưu tiên.

Công nghệ kháng thể đơn dòng (mAb) 25 năm qua đã tạo ra một kho rất lớn các thuốc thử hữu dụng trong nghiên cứu và đem lại cơ hội sử dụng các kháng thể dưới dạng dược chất được chấp thuận dùng trong liệu pháp điều trị bệnh ung thư, các rối loạn tự miễn, thải loại mảnh ghép, dự phòng chống virut và dưới dạng các chất chống tạo huyết khối (Glennie and Johnson, 2000). Việc ứng dụng kỹ thuật phân tử để chuyển mAb ở chuột thành mAB dạng khảm (vùng V ở chuột, vùng C ở người) và các thuốc thử được làm giống như của người, ở đây chỉ có các vùng CDR có nguồn gốc ở chuột là yếu tố đảm bảo cho sự thành công của liệu pháp sử dụng mAb trong lâm sàng. Các mAb được xử lý kỹ thuật được làm giảm đáng kể hoặc không có tính sinh miễn dịch, thời gian bán hủy tăng và phần Fc ở người của mAb làm tăng khả năng thu nhập các tác động miễn dịch của tế bào bổ trợ và tế bào gây độc tế bào (Clark 2000). Các nghiên cứu trong phân bố sinh học, dược động học và việc tạo ra đáp ứng miễn dịch bất đối với các mAb được dùng đều yêu cầu phát triển các phép phân tích để phân biệt giữa protein trong dược phẩm đưa vào và protein nội sinh.

Các kháng thể, hoặc mảnh bất kỳ của chúng, có thể cũng được cho dung hợp hoặc dung hợp tái tổ hợp với độc tố tế bào, vi khuẩn bất kỳ hoặc các thành phần khác, ví dụ ngoại độc tố của vi khuẩn *Pseudomonas*, chất rixin, hoặc độc tố bạch cầu. Phần độc tố được sử dụng có thể là toàn bộ độc tố, hoặc phần bất kỳ của nó. Các phân tử kháng thể-độc tố này có thể thành công trong việc sử dụng để hướng đích và điều trị các loại bệnh ung thư khác nhau, ví dụ xem tài liệu: Pastan, Biochim Biophys Acta. 1997 Oct 24; 1333 (2):C1-6; Kreitman et al., N. Engl. J. Med. 2001 Jul 26; 345 (4):241-7; Schnell et al., Leukemia. 2000 Jan; 14 (1):129-35; Ghetie et al., Mol. Biotechnol. 2001 Jul; 18 (3):251-68.

Các multime có hai và ba vùng liên kết đặc hiệu có thể được tạo ra bằng cách kết hợp các các phân tử scFv và được thiết kế dưới dạng các thuốc thử liên kết chéo để thu nhận tế bào T vào các khối u (liệu pháp điều trị miễn dịch), tái tạo đích virut (liệu pháp gen) và dưới dạng các thuốc thử ngưng kết tố hồng cầu (chẩn đoán miễn dịch), ví dụ xem tài liệu: Todorovska et al., *J. Immunol. Methods*. 2001 Feb 1; 248 (1-2):47-66; Tomlinson et al., *Methods Enzymol*. 2000; 326:461-79; McCall et al., *J. Immunol*. 2001 can 15; 166 (10):6112-7.

Các kháng thể đầy đủ ở người có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột chuyển gen mang các phần lớn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch ở người. Các loại chuột chuyển gen này, ví dụ Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) (US 6,075,181 và 6,150,584), HuMAb-Mouse™ (Medarex, Inc./GenPharm) (US 5,545,806 và US 5,569,825), TransChromo Mouse (Kirin) và KM Mouse (Medarex/Kirin), là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sau đó, các kháng thể có thể được tạo ra bằng, ví dụ kỹ thuật lai chuẩn hoặc bằng thư viện biểu hiện thể thực khuẩn. Các kháng thể này sau đó sẽ chỉ chứa các trình tự axit amin đầy đủ ở người.

Các kháng thể đầy đủ ở người cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng thư viện biểu hiện thể thực khuẩn từ các thư viện biểu hiệ ở người. Thư viện biểu hiện thể thực khuẩn có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được đề cập trong tài liệu: Hoogenboom et al. and Marks et al. (Hoogenboom HR and Winter G. (1992) J.

Mol. Biol. 227 (2):381-8; Marks JD et al. (1991) J. Mol. Biol. 222 (3):581-97; và cũng trong US 5,885,793 và 5,969,108).

Kháng thể trị liệu và việc sử dụng kháng thể này

Các đặc tính *in vivo*, cụ thể là liên quan đến tỷ lệ u:máu và tốc độ thanh thải, của các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế ít nhất sẽ tương đương với mAb806. Việc cho đối tượng là người hoặc động vật sử dụng cho thấy có tỷ lệ u:máu lớn nhất > 1:1. Tốt hơn, nếu ở tỷ lệ này phần tử liên kết đặc hiệu cũng sẽ có tỷ lệ u:cơ quan lớn hơn 1:1, tốt hơn, nếu lớn hơn 2:1, tốt hơn nữa, nếu lớn hơn 5:1. Tốt hơn, nếu theo tỷ lệ này thì phần tử liên kết đặc hiệu sẽ có tỷ lệ cơ quan: máu < 1:1 ở các cơ quan nằm xa vị trí của u. Các tỷ lệ này không bao gồm các cơ quan chuyển hóa và tiết phần tử liên kết đặc hiệu được sử dụng. Do đó, với các scFvs và Fabs (như được nêu trong các ví dụ đi kèm), các phần tử liên kết được đào thải thông qua thận và có mặt ở thận với hàm lượng lớn hơn so với các cơ quan khác. Với các IgG nguyên vẹn, độ thanh thải sẽ, ít nhất là một phần, được tiết qua gan. Tỷ lệ hạn định đỉnh tại một vị trí của kháng thể nguyên vẹn thu được thường nằm trong khoảng từ 10 đến 200 giờ sau khi sử dụng phần tử liên kết đặc hiệu đó. Cụ thể hơn, tỷ lệ này có thể được xác định trong các mảnh ghép u khác loài vào khoảng 0,2-1,0 g được tạo ra dưới da ở một bên sườn của chuột trụi lông thiếu tuyến ức.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc chất đánh dấu chức năng. Các chất đánh dấu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đánh dấu phóng xạ như các đồng vị phóng xạ ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{121}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{211}At, ^{198}Au, ^{67}CU, ^{225}Ac, ^{213}Bi, ^{99}Tc và ^{186}Re, mà có thể được gắn vào các kháng thể theo sáng chế bằng phương pháp hóa học thông thường đã biết trong lĩnh vực chụp ảnh kháng thể. Các chất đánh dấu cũng bao gồm các chất đánh dấu phát huỳnh quang và các chất đánh dấu được sử dụng thuận tiện trong lĩnh vực kỹ thuật chụp ảnh MRI-CT. Chúng cũng bao gồm các chất đánh dấu là enzym như peroxidaza của cây cải ngựa. Các chất đánh dấu còn bao gồm các nhóm hóa học như biotin có thể được phát hiện nhờ liên kết với nhóm có thể phát hiện được và có cùng gốc đặc hiệu, ví dụ avidin được đánh dấu.

Các chất đánh dấu chức năng bao gồm các chất được thiết kế là được tạo đích đối với vị trí u để gây ra sự phá hủy mô u. Các chất đánh dấu chức năng này bao gồm các dược chất gây độc tế bào như 5-floraxil hoặc rixin và các enzym như carboxypeptidaza

vi khuẩn hoặc nitroreductaza, có khả năng chuyển hóa các tiền dược chất thành các dược chất tại vị trí u.

Tương tự, các kháng thể kể cả kháng thể đa dòng lẫn đơn dòng, và các dược chất có tác dụng điều hòa sự sản sinh hoặc hoạt tính của các phần tử liên kết đặc hiệu, các kháng thể và/hoặc các tiểu đơn vị của chúng có thể có các ứng dụng nhất định trong chẩn đoán và có thể ví dụ, được sử dụng cho mục đích phát hiện và/hoặc xác định các tình trạng bệnh như bệnh ung thư, các thương tổn tiền ung thư, các tình trạng bệnh liên quan đến hoặc là kết quả của sự phát triển siêu tăng sinh của tế bào hoặc các quá trình khác tương tự. Ví dụ, các phần tử liên kết đặc hiệu, các kháng thể hoặc các tiểu đơn vị của chúng có thể được sử dụng để tạo ra cả kháng thể đa dòng lẫn kháng thể đơn dòng trong rất nhiều môi trường tế bào, bằng các kỹ thuật đã biết như kỹ thuật lai sử dụng ví dụ, các tế bào lympho lá lách ở chuột và các tế bào tủy. Tương tự, các phân tử nhỏ bắt chước hoặc mô phỏng (các) hoạt tính của các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế có thể được phát hiện hoặc tổng hợp, và có thể hữu dụng trong các quy trình chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh.

Các phần tử liên kết đặc hiệu được đánh dấu phóng xạ, nghĩa là các kháng thể và các mảnh của nó, hữu dụng trong các kỹ thuật chẩn đoán *in vitro* và trong các kỹ thuật chụp ảnh phóng xạ *in vivo* và trong liệu pháp miễn dịch phóng xạ. Trong chụp ảnh *in vivo*, các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế có thể được cho dung hợp với chất chụp ảnh chứ không phải là (các) đồng vị phóng xạ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất tăng cường hiện ảnh cộng hưởng từ hạt nhân, trong đó ví dụ phân tử kháng thể được nạp cùng với một số lượng lớn các ion đẳng từ thông qua các nhóm chelat hóa. Ví dụ về các nhóm chelat hóa bao gồm EDTA, porphyrin, polyamin crown ete và polyoxim. Ví dụ về các ion đẳng từ bao gồm gadolini, sắt, magiê, rheni, europi, lanthani, holmi và erbi. Theo một phương án khác của sáng chế, các phần tử liên kết đặc hiệu được đánh dấu phóng xạ, nghĩa là các kháng thể và các mảnh của nó, cụ thể là các thể dung hợp miễn dịch phóng xạ, hữu dụng trong liệu pháp miễn dịch phóng xạ, cụ thể là như các kháng thể được dấu phóng xạ dùng cho liệu pháp ung thư. Theo một phương án khác nữa, các phần tử liên kết đặc hiệu được đánh dấu phóng xạ, nghĩa là các kháng thể và các mảnh của nó, hữu dụng trong các kỹ thuật phẫu thuật theo phóng xạ miễn dịch, trong đó chúng có thể xác định và chỉ ra sự có mặt và/hoặc vị trí

của các tế bào ung thư, các tế bào tiền ung thư, các tế bào u, và các tế bào siêu tăng sinh, trước, trong khi hoặc sau khi phẫu thuật để loại bỏ các tế bào này.

Các thể dung hợp miễn dịch hoặc các protein dung hợp kháng thể theo sáng chế, trong đó các phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là các kháng thể và các mảnh của nó, theo sáng chế được dung hợp với hoặc gắn với các phân tử hoặc các chất khác còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phần tử liên kết được dung hợp với chất ăn mòn hóa học, độc tố, chất điều hòa miễn dịch, xytokin, chất gây độc tế bào, hóa chất trị liệu hoặc dược chất.

Liệu pháp điều trị bằng miễn dịch phóng xạ (RAIT) đã cho hiệu quả lâm sàng và hiệu quả được chứng thực bằng cách sử dụng nhiều thể dung hợp miễn dịch kháng thể khác nhau. Kháng thể của kháng nguyên kháng CEA được đánh dấu bằng $^{131}1$ và được làm giống như của người được đánh giá đối với bệnh ung thư ruột trực tràng (Behr TM et al (2002) Cancer 94 (4Suppl):1373-81) và kháng thể này cũng được đánh dấu bằng 90Y để dùng trong đánh giá ung thư giáp thể tủy (Stein R et al (2002) Cancer 94 (1):51-61). Liệu pháp miễn dịch phóng xạ bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng cũng được đánh giá và báo cáo đối với bệnh ung thư tuyến tụy và ung thư không bạch huyết Hodgkin (Goldenberg DM (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39 (1-2):195-201; Gold DV et al. (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39 (1-2) 147-54). Các phương pháp điều trị bằng miễn dịch phóng xạ sử dụng các kháng thể cụ thể cũng được mô tả trong US 6,306,393 và US 6,331,175. Phương pháp phẫu thuật bằng miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoguided surgery - RIGS) cũng có hiệu quả và tính hữu dụng trong lâm sàng và được chứng nhận, bao gồm sử dụng các kháng thể kháng CEA và các kháng thể định hướng vào các kháng nguyên kết hợp u (Kim JC et al (2002) Jut. J. Cancer 97(4):542-7; Schneebaum, S. et al. (2001) World J. Surg. 25(12):1495-8; Avital, S. et al. (2000) Cancer 89(8):1692-8; Mcintosh DG et al (1997) Cancer Biother. Radiopharm. 12 (4):287-94).

Các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị qua đường dùng bất kỳ thích hợp, thường bằng cách tiêm vào trong máu hoặc CSF, hoặc trực tiếp vào vị trí u. Liều chính xác sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố, bao gồm kháng thể được dùng để chẩn đoán hay điều trị, kích thước và vị trí của u, bản chất cụ thể của kháng thể (kháng thể nguyên vẹn, mảnh, diabody, v.v..), và bản chất của chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc chất đánh dấu chức năng được gắn vào kháng

thể. Khi tác nhân phóng xạ được sử dụng cho liệu pháp, thì liều đơn lớn nhất thích hợp vào khoảng 45 mCi/m^2, đến tối đa vào khoảng 250 mCi/m^2. Liều được ưu tiên nằm trong khoảng từ 15 đến 40 mCi, tốt hơn là khoảng liều lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 30 mCi, hoặc từ 10 đến 30 mCi. Liệu pháp này có thể cần sự thay thế tủy xương hoặc tế bào mầm. Liều thông thường của kháng thể để chụp ảnh khối u hoặc điều trị khối u sẽ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 40 mg, tốt hơn, nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 4 mg kháng thể nếu ở dạng F(ab')2. Các kháng thể trần được ưu tiên dùng ở liều nằm trong khoảng từ 20 đến 1000 mg protein/liều, hoặc từ 20 đến 500 mg protein/liều, hoặc từ 20 đến 100 mg protein/liều. Đây là liều dùng cho chế độ đơn trị liệu đối với bệnh nhân là người lớn, liều này có thể được điều chỉnh theo tỷ lệ phù hợp đối với trẻ em và trẻ sơ sinh, và cũng được điều chỉnh tỷ lệ so với khối lượng phân tử đối với các dạng khác của kháng thể. Việc sử dụng có thể được lặp lại hàng ngày, hai lần một tuần, hàng tuần hoặc hàng tháng, theo hướng dẫn của bác sĩ.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa protein liên kết thứ hai, như các protein liên kết với EGPR được mô tả ở trên. Ở dạng được ưu tiên đặc biệt, protein liên kết thứ hai này là kháng thể đơn dòng như kháng thể 528 hoặc kháng thể 225, như được đề cập ở trên.

Dược chất và dược phẩm

Các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế thường được dùng ở dạng dược phẩm, có thể chứa ít nhất một thành phần khác ngoài phần tử liên kết đặc hiệu.

Do đó, các dược phẩm theo sáng chế, và để sử dụng theo sáng chế, có thể bao gồm, ngoài thành phần hoạt tính thì tá dược, chất mang, chất đệm, chất làm ổn định dược dụng hoặc thành phần khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này này. Các thành phần khác này thường không độc và không ảnh hưởng đến hiệu quả của thành phần có hoạt tính. Bản chất chính xác của chất mang hoặc nguyên liệu khác phụ thuộc vào đường dùng, có thể là qua đường miệng hoặc bằng cách tiêm, ví dụ trong tĩnh mạch.

Các dược phẩm để dùng qua đường miệng có thể ở dạng viên nén, viên nang, dạng bột hoặc lỏng. Viên nén có thể bao gồm chất mang rắn như gelatin hoặc chất điều chỉnh. Các dược phẩm dạng lỏng thường chứa chất mang lỏng như nước, dầu, mỡ động vật hoặc dầu thực vật, dầu khoáng hoặc dầu tổng hợp. Dung dịch nước muối sinh

lý, dextroza hoặc dung dịch sacarit khác hoặc có thể chứa các glycol như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol.

Để tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm vào vị trí bị đau, thành phần hoạt tính sẽ ở dạng dung dịch nước có thể dùng ngoài đường tiêu hóa và không chứa pyrogen và có độ pH, tính đẳng trương và đổ ổn định thích hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng chuẩn bị các dung dịch thích hợp, sử dụng các chất dẫn đẳng trương như dung dịch tiêm natri clorua, dung dịch tiêm Ringer, dung dịch tiêm Lactated Ringer. Chế phẩm có thể chứa các chất bảo quản, chất làm ổn định, chất đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc các phụ gia khác, nếu cần.

Dược phẩm có thể được dùng riêng lẻ hoặc kết hợp với các phương pháp điều trị, các chất hoặc chất trị liệu khác, đồng thời hoặc lần lượt tùy vào tình trạng bệnh được điều trị. Ngoài ra, sáng chế cũng dự định bao gồm các dược phẩm chứa phần tử liên kết, nghĩa là kháng thể hoặc mảnh của nó, được mô tả ở đây và các chất hoặc phương pháp trị liệu khác như các chất chống ung thư, các hormon, các chất hoặc các kháng thể kháng EGFR, hoặc chất điều hòa miễn dịch. Thông thường các chất chống ung thư này có thể là các chất ức chế enzym tyrosin kinaza hoặc các chất ức chế các đợt phosphoryl hóa, các chất điều hòa sau dịch mã, các chất ức chế sự phát triển hoặc phân chia tế bào (ví dụ, các chất chống gián phân), hoặc các chất ức chế dẫn truyền tín hiệu. Các phương pháp trị liệu khác có thể bao gồm dùng liều chất giảm đau thích hợp như các dược chất chống viêm không steroit (ví dụ, aspirin, paracetamol, ibuprofen hoặc ketoprofen) hoặc các opiat như morphin, hoặc chất chống nôn. Dược phẩm có thể được dùng kết hợp với (một cách lần lượt (nghĩa là, trước hoặc sau) hoặc đồng thời) với các chất ức chế enzym tyrosin kinaza (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AG1478 và ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorubixin, temozolomit, cisplatin, carboplatin, nitrosoure, procarbazin, vincristin, hydroxyurea, 5-fluoruraxil, xytosin arabinosit, xyclophosphamit, epipodophyllotoxin, carmustin, lomustin và/hoặc các hóa chất trị liệu khác. Do đó, các chất này có thể là các chất kháng EGFR đặc hiệu, hoặc các chất ức chế enzym tyrosin kinaza như AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, hoặc SU-6668 hoặc có thể là chất chống ung thư và chống tạo u mới như doxorubixin, temozolomit, cisplatin, carboplatin, nitrosoure, procarbazin, vincristin, hydroxyurea, 5-fluoruraxil, xytosin arabinosit, xyclophosphamit, epipodophyllotoxin, carmustin, lomustin. Ngoài ra, dược phẩm nêu trên có thể được dùng cùng với các hocmon như

dexametason, các chất điều hòa miễn dịch, như các interleukin, yếu tố hoại tử u (tumor necrosis factor - TNF) hoặc các yếu tố sinh trưởng hoặc các xytokin có tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch và làm giảm hoặc loại bỏ các tế bào ung thư hoặc các khối u.

Các chất điều hòa miễn dịch như TNF có thể được kết hợp với phần tử theo sáng chế ở dạng kháng thể đặc hiệu kép nhận biết epitop EGFR được nhận biết bởi các kháng thể theo sáng chế, cũng như liên kết với các thụ thể TNF. Dược phẩm nêu trên cũng có thể được sử dụng cùng với, hoặc có thể bao gồm các hỗn hợp chứa kháng thể kháng EGFR khác, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể kháng EGFR 528, 225, SC-03, DR8. 3, L8A4, Y10, ICR62 và ABX-EGF.

Trước đây, việc sử dụng các chất như doxorubixin và cisplatin kết hợp với kháng thể kháng EGFR đã tạo ra hoạt tính kháng u tăng cường (Fan et al, 1993; Baselga et al, 1993). Hỗn hợp bao gồm doxorubicin và mAb 528 làm tiêu tan hoàn toàn các u ghép khác loài A431 được tạo ra, trong khi đó nếu điều trị bằng một hợp chất thì chúng chỉ gây ra sự ức chế phát triển tạm thời *in vivo* (Baselga et al, 1993). Ngược lại, hỗn hợp bao gồm cisplatin và mAb528 hoặc 225 cũng làm tiêu tan hoàn toàn các u ghép khác loài A431 được tạo ra, điều mà không phát hiện được nếu điều trị bằng một trong số hai chất nêu trên (Fan et al, 1993).

Liệu pháp xạ trị thông thường

Ngoài ra, sáng chế bao gồm và dự định bao gồm các thành phần trị liệu để sử dụng phần tử liên kết kết hợp với liệu pháp xạ trị thông thường. Cũng đã được chỉ ra là việc điều trị bằng các kháng thể có đích là các thụ thể EGF có thể làm tăng hiệu quả của liệu pháp xạ trị thông thường (Milas et al., Clin. Cancer Res. 2000 Feb:6 (2):701, Huang et al., Clin. Cancer Res. 2000 Jun:6 (6):2166).

Như đã thể hiện ở đây, các hỗn hợp chứa phần tử liên kết theo sáng chế, nghĩa là kháng thể hoặc mảnh của nó, tốt hơn là mAb806, ch806, mAb175, mAb124, mAb1133 hoặc hu806 hoặc mảnh của nó, và các chất trị liệu chống-ung thư, cụ thể là các chất trị liệu kháng EGFR, bao gồm các kháng thể kháng EGFR khác, cho thấy liệu pháp hiệu quả, và nhất là trong phẫu thuật các khối u được ghép khác loài. Trong các ví dụ, đã chứng minh được rằng, ví dụ hỗn hợp gồm AG1478 và mAb806 có tác dụng làm giảm thể tích u ghép khác loài A431 tăng lên đáng kể so với khi điều trị bằng một trong hai chất nêu trên. AG1478 (4-(3-cloanilino)-6,7-dimetoxyquinazolin) là một chất

ức chế có hoạt lực và tính chọn lọc của kinza thụ thể EGF và được mô tả cụ thể trong US 5,457,105 (cũng xem tài liệu: Liu, W. et al (1999) J. Cell Sci. 112:2409; Eguchi, S. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:8890; Levitsky, A. and Gazit, A. (1995) Science 267:1782). Các ví dụ trong phần mô tả giải thích thêm về tác dụng hiệp đồng của các kháng thể theo sáng chế với các kháng thể kháng EGFR khác, cụ thể là với kháng thể kháng EGFR 528.

Sáng chế còn dự tính đến các chế phẩm có tác dụng trị liệu được sử dụng để thực hành trong các phương pháp điều trị theo sáng chế. Chế phẩm mong muốn bao gồm, trong hỗn hợp, tá dược (chất mang) dược dụng và một hoặc nhiều phần tử liên kết đặc hiệu, chất tương tự polypeptit của nó hoặc mảnh của nó, như được mô tả theo sáng chế làm thành phần có hoạt tính. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm này chứa kháng nguyên có khả năng điều hòa liên kết đặc hiệu của phần tử/kháng thể liên kết có mặt với tế bào đích.

Việc chuẩn bị chế phẩm chứa các polypeptit, các chất tương tự hoặc các mảnh có hoạt tính làm các thành phần có hoạt tính là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Thông thường, các chế phẩm này được ưu tiên ở dạng có thể tiêm được, dưới dạng dung dịch hoặc hỗn dịch lỏng. Tuy nhiên, các dạng rắn thích hợp cho dung dịch trong, hoặc hỗn dịch trong chất lỏng trước khi tiêm cũng có thể được bào chế. Chế phẩm này cũng có thể được nhũ hóa. Thành phần có tác dụng trị liệu thường được trộn với các tá dược dược dụng và tương hợp với các thành phần có hoạt tính. Các tá dược thích hợp là, ví dụ, nước, nước muối, dextroza, glyxerol, etanol, hoặc các chất tương tự khác và hỗn hợp của chúng. Ngoài ra, nếu muốn, dược phẩm có thể chứa một lượng nhỏ các hợp chất phụ trợ như chất làm ẩm, hoặc chất nhũ hóa, các chất đệm pH có tác dụng làm tăng hiệu quả của thành phần có hoạt tính.

Polypeptit, thể tương đồng hoặc mảnh có hoạt tính của nó có thể được bào chế theo công thức thành chế phẩm có tác dụng trị liệu như các dạng muối dược dụng được trung hòa. Các muối dược dụng bao gồm các muối cộng axit (được tạo thành từ các nhóm amin tự do của polypeptit hoặc phân tử kháng thể) và được tạo thành bằng các axit vô cơ như ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit vô cơ như axit axetic, oxalic, tartaric, mandelic và các axit hữu cơ khác. Các muối được tạo thành từ các nhóm carboxyl tự do cũng có thể thu được từ các bazơ vô cơ như, ví dụ, natri,

kali, amoni, canxi, hoặc sắt hydroxit, và các bazơ vô cơ như isopropylamin, trimetylamin, 2-etylamino etanol, histidin, procain và các bazơ vô cơ tương tự khác.

Các chế phẩm chứa polypeptit có tác dụng trị liệu, chất tương tự hoặc mảnh có hoạt tính của nó để thuận lợi dùng trong tĩnh mạch, như bằng cách tiêm một liều đơn vị, chẳng hạn. Thuật ngữ "liều đơn vị" được sử dụng khi đề cập đến chế phẩm có tác dụng trị liệu theo sáng chế chỉ các đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp để dùng một lần duy nhất cho người, mỗi đơn vị chứa một lượng xác định thành phần hoạt tính đã được tính trước để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn khi kết hợp với chất pha loãng nếu cần; nghĩa là, chất mang, hoặc chất dẫn.

Các chế phẩm được dùng theo cách tương hợp với dạng trình bày liều và với lượng cho hiệu quả điều trị. Lượng được dùng phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, khả năng sử dụng thành phần có hoạt tính của hệ miễn dịch của đối tượng, và mức độ của khả năng liên kết EFGR mong muốn. Các lượng chính xác của thành phần có hoạt tính cần thiết được dùng phụ thuộc vào kinh nghiệm của người thực hành và cụ thể đối với từng cá thể. Tuy nhiên, các liều thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10, và tốt hơn nữa là từ một đến một vài mg thành phần có hoạt tính trên một kg thể trọng cá thể mỗi ngày và phụ thuộc vào đường dùng. Chế độ dùng thích hợp sử dụng lần đầu và các lần nhắc lại thay đổi, nhưng thông thường bắt đầu sử dụng và sau đó là dùng các liều nhắc lại cách một hoặc một vài giờ bằng cách tiêm hoặc dùng theo đường dùng khác. Theo cách khác, việc truyền liên tục vào tĩnh mạch đủ để duy trì nồng độ từ 10 nmol đến 10 μmol trong máu cũng được dự định.

Các dược phẩm dùng qua đường miệng có thể ở dạng viên nén, viên nang, dạng bột hoặc lỏng. Dạng viên nén có thể bao gồm chất mang rắn như gelatin hoặc chất điều chỉnh. Các dược phẩm dạng lỏng thường chứa chất mang lỏng như nước, dầu, dầu động vật hoặc thực vật, dầu khoáng hoặc dầu tổng hợp. Dược phẩm có thể chứa dung dịch nước muối sinh lý, dextroza hoặc dung dịch sacarit khác hoặc các glycol như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol.

Để tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm vào vị trí bị đau, thành phần có hoạt tính sẽ ở dạng dung dịch nước có thể dùng ngoài đường tiêu hóa và không chứa pyrogen và có độ pH, tính đẳng trương và đổ ổn định thích hợp. Người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng điều chế các dung dịch thích hợp, sử dụng các chất dẫn đẳng trương như dung dịch tiêm natri clorua, dung dịch tiêm Ringer, dung dịch tiêm Lactated Ringer. Dược phẩm co thể chứa các chất bảo quản, chất làm ổn định, chất đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc các phụ gia khác, nếu cần

Các thử nghiệm chẩn đoán

Sáng chế cũng đề cập đến rất nhiều ứng dụng trong chẩn đoán, bao gồm các phương pháp để phát hiện sự có mặt của các kích thích tố như EGFR được biểu hiện bất thường, bằng cách tham chiếu đến khả năng của chúng được nhận biết bởi phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế. Như đã đề cập ở phần đầu, EGFR có thể được sử dụng để tạo chính các kháng thể đó bằng nhiều kỹ thuật đã biết, và các kháng thể này sau đó có thể được tách và sử dụng trong các thử nghiệm xác định sự có mặt của một hoạt tính cụ thể của EGFR đối với các tế bào đích.

Các ứng dụng trong chẩn đoán của các phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, nghĩa là các kháng thể và các mảnh của nó, bao gồm các ứng dụng *in vitro* và *in vivo* là đã biết và được chuẩn hóa bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật khi dựa vào phần mô tả của sáng chế. Các thử nghiệm chẩn đoán và kit dùng kiểm tra và đánh giá trạng thái của EGFR *in vitro*, cụ thể là liên quan đến sự biểu hiện bất thường của EGFR, có thể được sử dụng để kiểm tra, đánh giá và theo dõi các mẫu từ bệnh nhân bao gồm các mẫu mắc hoặc nghi ngờ mắc bệnh ung thư, tình trạng bệnh tiền ung thư, tình trạng bệnh liên quan đến sự sinh trưởng siêu tăng sinh của tế bào hoặc liên quan đến mẫu khối u. Việc kiểm tra và đánh giá trạng thái của EGFR cũng hữu dụng trong việc xác định khả năng thích ứng của bệnh nhân với thử nghiệm dược chất trong lâm sàng hoặc khả năng thích ứng của bệnh nhân đối với việc sử dụng một hóa chất trị liệu cụ thể hoặc phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là kháng thể, theo sáng chế, bao gồm hỗn hợp của chúng, với các chất hoặc phần tử liên kết khác nhau. Loại theo dõi và đánh giá để chẩn đoán này đã được thực hành sử dụng các kháng thể kháng protein HER2 trong bệnh ung thư vú (Hercep Test, Dako Corporation), trong đó thử nghiệm cũng được sử dụng để đánh giá các bệnh nhân đối với liệu pháp kháng thể sử dụng Herceptin. Các ứng dụng *in vivo* bao gồm chụp ảnh các khối u hoặc đánh giá tình trạng ung thư của cá thể, bao gồm chụp ảnh phóng xạ.

Như được đề cập ở trên, phương pháp chẩn đoán theo sáng chế bao gồm việc xét nghiệm mẫu tế bào hoặc miễn dịch bằng các công cụ thử nghiệm bao gồm lượng hữu

hiệu chất đối kháng với EFGR/protein, như kháng thể kháng EFGR, tốt hơn là kháng thể đa dòng được tinh chế theo ái lực, và tốt hơn nữa là mAb. Ngoài ra, được ưu tiên là các phân tử kháng thể kháng EFGR được sử dụng ở đây là phần Fab, Fab', F $(ab')_2$ hoặc F (v) hoặc các phân tử kháng thể nguyên vẹn. Như đã đề cập ở trên, các bệnh nhân có khả năng hưởng lợi từ phương pháp này bao gồm các bệnh nhân mắc bệnh ung thư, tổn thương tiền ung thư, nhiễm virut, các bệnh lý liên quan đến hoặc là kết quả của quá trình phát triển siêu tăng sinh của tế bào hoặc sự rối loạn mang tính bệnh lý khác. Tất cả các phương pháp để tách EFGR và tạo ra các kháng thể kháng EFGR và xác định và tối ưu hóa khả năng của các kháng thể kháng EFGR để hỗ trợ việc xác định các tế bào đích đều là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tốt hơn nếu kháng thể kháng EFGR được sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán theo sáng chế là kháng thể đa dòng được tinh chế theo ái lực. Tốt hơn nữa nếu kháng thể này là kháng thể đơn dòng (mAb). Ngoài ra, các phân tử kháng thể kháng EFGR được sử dụng theo sáng chế ở dạng phần Fab, Fab', F $(ab')_2$ hoặc F (v) của các phân tử kháng thể nguyên vẹn.

Như được đề cập chi tiết ở trên, (các) kháng thể của EGFR có thể được tạo ra và phân lập bằng các phương pháp chuẩn bao gồm các kỹ thuật lai đã biết. Để thuận tiện, (các) kháng thể của EGFR được đề cập ở đây là Ab_1 và (các) kháng thể cũng có dạng khác đó là Ab_2.

Sự có mặt của EGFR trong tế bào có thể được xác định bằng các quy trình miễn dịch học *in vitro* hoặc *in vivo* thông thường có khả năng sử dụng cho các xét nghiệm như vậy. Một số quy trình hữu ích là đã biết. Ba quy trình mà đặc biệt hữu ích hoặc là xác định EGFR được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được, kháng thể Ab, được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được, hoặc kháng thể Ab2 được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được. Các quy trình này có thể được tóm tắt bằng các phương trình dưới đây, trong đó dấu * thể hiện phần tử được đánh dấu, "R" là EGFR:

A. $R^* + Ab_1 = R^*Ab_1$,

B. $R + Ab^* = RAb_1^*$

C. $R + Ab_1 + Ab_2^* = RAb_1Ab_2^*$

Tất cả các quy trình và ứng dụng của chúng đều quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và do đó, có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế. Quy trình "cạnh tranh", Quy trình A, được mô tả trong US 3,654,090 và 3,850,752. Quy trình C, quy trình "bánh kẹp", được mô tả trong US RE 31,006 và 4,016,043. Các quy trình khác được biết dưới dạng quy trình "kháng thể kép" hoặc "DASP".

Trong từng trường hợp ở trên, EGFR tạo thành phức chất với một hoặc nhiều kháng thể hoặc các phần tử liên kết và một trong số các phần tử của phức chất được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được. Thực tế là phức chất được tạo thành, và nếu muốn, lượng phức chất này có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết có khả năng sử dụng để phát hiện các chất đánh dấu.

Từ các phần trên thấy rằng tính chất đặc trưng của Ab_2 là phản ứng với Ab_1. Điều này là do Ab_1 được tạo ra trong động vật có vú và có thể được sử dụng trong loài khác làm kháng nguyên để tạo ra kháng thể Ab_2. Ví dụ, Ab_2 có thể được tạo ra trong dê bằng cách sử dụng kháng thể thỏ làm kháng nguyên. Do đó, Ab_2 sẽ là kháng thể kháng thỏ được tạo ra trong dê. Với mục đích của phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, Ab_1 sẽ được đề cập là kháng thể thứ nhất hoặc kháng-kháng thể EGFR, và Ab_2 sẽ được đề cập là kháng thể thứ hai hoặc kháng thể kháng-Ab_1.

Các chất đánh dấu thường xuyên được sử dụng cho các nghiên cứu này là các nguyên tố có hoạt tính phóng xạ, các enzym, các hóa chất phát huỳnh quang khi tiếp xúc với ánh sáng cực tím và các loại ánh sáng khác.

Một số nguyên liệu phát huỳnh quang là đã biết và có thể được sử dụng làm chất đánh dấu. Các nguyên liệu này bao gồm, ví dụ, fluoretxein, rodamin, auramin, đỏ Texas, xanh AMCA vàng Lucifer. Nguyên liệu phát hiện cụ thể là kháng thể kháng thỏ được tạo ra trong dê và dung hợp với fluoretxein thông qua isothioxyanat.

EGFR hoặc (các) phần tử liên kết của nó như phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế, cũng có thể được đánh dấu bằng nguyên tố có hoạt tính phóng xạ hoặc bằng enzym. Chất đánh dấu có hoạt tính phóng xạ có thể được phát hiện bằng các quy trình đếm bất kỳ hiện có. Đồng vị được ưu tiên có thể được chọn từ ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{121}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{211}At, ^{198}Au, ^{67}Cu ^{225}Ac, ^{213}Bi, ^{99}Tc và ^{186}Re.

Tương tự, các chất đánh dấu enzym cũng hữu dụng, và có thể được phát hiện bằng kỹ thuật so màu, quang phổ, huỳnh quang phổ, đo dòng điện hoặc đo khí hiện đang được sử dụng. Enzym này được dung hợp với phần tử được chọn bằng phản ứng với các phân tử bắc cầu như các carbodiimit, các diisoxyanat, glutaraldehyt và các phân tử bắc cầu khác. Nhiều enzym có thể hữu dụng trong các quy trình này là đã biết và có thể được sử dụng. Enzym được ưu tiên là peroxidaza, β-glucuronidaza, β-D-glucosidaza, β-D-galactosidaza, ureaza, glucoza oxidaza + peroxidaza và phosphataza kiềm. Nguyên liệu đánh dấu thay thế và các phương pháp nêu trong US 3,654,090; US 3,850,752; và US 4,016,043 là các ví dụ.

Hệ thống thử nghiệm cụ thể có thể được sử dụng thuận lợi theo sáng chế là đã biết dưới dạng thụ thể. Trong thử nghiệm thụ thể, thành phần liệu được thử nghiệm dưới dạng phần tử liên kết đặc hiệu, được đánh dấu thích hợp và sau đó, một nhóm thử nghiệm tế bào nhất định được chủng với lượng của cả thành phần được đánh dấu lẫn không được đánh dấu, sau đó tiến hành nghiên cứu liên kết để xác định mức độ thành phần được đánh dấu với các thụ thể tế bào. Theo cách này, có thể xác định được sự khác nhau giữa ái lực của thành phần được đánh dấu với thành phần không được đánh dấu.

Do đó, lượng đã tinh chế của phần tử liên kết đặc hiệu có thể được đánh dấu phóng xạ và kết hợp, ví dụ, với các kháng thể hoặc các chất ức chế khác, sau đó tiến hành các nghiên cứu liên kết. Sau đó, các dung dịch sẽ được chuẩn bị sao cho chúng chứa các lượng khác nhau của phần tử liên kết đặc hiệu chưa kết hợp và được đánh dấu và không được đánh dấu, và các mẫu tế bào sau đó được chủng và sau đó, được ủ. Sau đó các tế bào đơn lớp này được rửa, làm tan và đếm trong máy đếm gama với khoảng thời gian đủ lớn để thu được sai số chuẩn < 5%. Số liệu này sau đó được đưa vào phân tích Scatchard, thu kết quả quan sát và đưa ra kết luận liên quan đến hoạt tính của thành phần thử nghiệm. Phần nêu trên là một ví dụ minh họa cách thức có thể tiến hành và sử dụng thử nghiệm thụ thể, và trong trường hợp này khả năng liên kết với tế bào của nguyên liệu được thử nghiệm có thể đóng vai trò làm đặc điểm phân biệt.

Một thử nghiệm hữu ích và được dự định theo sáng chế được biết là thử nghiệm "cis/trans". Tóm tắt như sau: thử nghiệm này sử dụng hai cấu trúc gen, một trong hai cấu trúc này là một plasmit thông thường biểu hiện liên tục một thụ thể cụ thể đang quan tâm khi được chuyển nhiễm vào trong dòng tế bào thích hợp, và cấu trúc gen thứ

hai là một plasmit biểu hiện gen thông báo như luciferaza, dưới sự kiểm soát của phức chất thụ thể/phối tử. Do đó, ví dụ, nếu muốn đánh giá một hợp chất dưới dạng phối tử với một thụ thể cụ thể thì một trong số các plasmit nêu trên sẽ được thiết kế để tạo ra sự biểu hiện thụ thể trong dòng tế bào đã chọn, trong khi đó plasmit thứ hai sẽ phải có trình tự gen tăng cường liên kết với gen luciferaza, trong đó được chèn yếu tố đáp ứng với thụ thể cụ thể nêu trên. Nếu thử nghiệm hợp chất là một chất đồng vận cho thụ thể nêu trên thì phối tử sẽ tạo phức với thụ thể này, và phức chất thu được sẽ liên kết với yếu tố đáp ứng và khởi động quá trình phiên mã của gen luciferaza. Ánh sáng phát quang hóa học sinh ra được đo bằng quang kế, và so sánh đường cong đáp ứng liều dùng thu được với các đường cong đáp ứng liều dùng của các phối tử đã biết. Quy trình nêu trên được mô tả chi tiết trong US 4,981,784 và WO 88/03168.

Theo một phương án khác của sáng chế, các kit thử nghiệm thương mại thích hợp để sử dụng cho chuyên gia y tế có thể được tạo ra để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của sự biểu hiện bất thường EGFR, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự khuếch đại EGFR và/hoặc sự đột biến của EGFR, trong các tế bào đích bị nghi ngờ. Liên quan đến các kỹ thuật thử nghiệm nêu trên trên, một nhóm các kit này sẽ chứa ít nhất một EGFR được đánh dấu hoặc phần tử liên kết của nó, ví dụ kháng thể đặc hiệu của nó, và tất nhiên, các hướng dẫn phụ thuộc vào phương pháp được chọn, ví dụ phương pháp "cạnh tranh" "bánh kẹp" "DASP" và các phương pháp tương tự khác. Kit này cũng có thể chứa các thuốc thử phụ trợ như các chất đệm, các chất làm ổn định, v.v..

Do đó, kit thử nghiệm có thể được tạo ra để xác định sự có mặt hoặc khả năng biểu hiện bất thường hoặc cải biến sau dịch mã của EGFR của các tế bào, trong đó kit này bao gồm:

(a) lượng xác định trước của ít nhất một thành phần dễ phản ứng hóa miễn dịch được đánh dấu thu được bằng cách gắn trực tiếp hoặc gián tiếp phần tử liên kết đặc hiệu hoặc phần tử liên kết đặc hiệu với nó, vào chất đánh dấu có thể phát hiện được;

(b) các thuốc thử khác; và

(c) các hướng dẫn sử dụng kit này.

Cụ thể, kit thử nghiệm chẩn đoán có thể bao gồm:

(a) một lượng đã biết của một trong số các phần tử liên kết đặc hiệu như được mô tả ở trên (hoặc phần tử liên kết với nó) thường liên kết với pha rắn để tạo ra chất hấp thụ miễn dịch, hoặc theo cách khác, liên kết với đuôi thích hợp, hoặc nhiều thành phần này, v.v., (hoặc các phần tử liên kết của chúng);

(b) nếu cần, các thuốc thử khác; và

(c) hướng dẫn sử dụng kit thử nghiệm này.

Theo một phương án khác nữa, kit thử nghiệm có thể được tạo ra và sử dụng cho các mục đích nêu trên, kit thử nghiệm này hoạt động theo quy trình được xác định trước (ví dụ, "cạnh tranh", "bánh kẹp", "kháng thể kép" v.v.), và kit này bao gồm:

(a) thành phần được đánh dấu có thể thu được bằng cách kết hợp phần tử liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu có thể phát hiện được;

(b) một hoặc nhiều thuốc thử hóa miễn dịch khác, trong đó ít nhất một thuốc thử là phối tử hoặc phối tử được cố định, phối tử này được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) phối tử có khả năng liên kết với thành phần được đánh dấu (a);

(ii) phối tử có khả năng liên kết với phần tử liên kết của thành phần được đánh dấu (a);

(iii) phối tử có khả năng liên kết với ít nhất một trong số (các) thành phần được xác định; và

(iv) phối tử có khả năng liên kết với ít nhất một trong số các phần tử liên kết của ít nhất một trong số (các) thành phần được xác định; và

(c) hướng dẫn thực hiện quy trình để phát hiện và/hoặc xác định một hoặc nhiều thành phần của phản ứng hóa miễn dịch giữa EFGR, phần tử liên kết đặc hiệu, và phần tử liên kết đặc hiệu với nó.

Theo như trên, hệ thống thử nghiệm dùng để sàng lọc các dược chất tiềm năng có hiệu quả trong việc điều hòa hoạt tính của EFGR, mà có thể tạo ra sự biểu hiện bất thường hoặc cải biến sau dịch mã của EGFR, và/hoặc hoạt tính hoặc liên kết của phần tử liên kết đặc hiệu. Thụ thể hoặc phần tử liên kết có thể được đưa vào trong hệ thống thử nghiệm, và dược chất tiềm năng cũng có thể được đưa vào trong môi trường nuôi cấy tế bào, và sau đó, môi trường nuôi cấy tế bào được xét nghiệm bằng cách quan sát

sự thay đổi bất kỳ trong hoạt tính của các tế bào tại pha A, do sự bổ sung dược chất tiềm năng một mình, hoặc do tác dụng của việc bổ sung lượng (các) chất đã biết.

Các axit nucleic

Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic được phân lập mã hóa phần tử liên kết đặc hiệu theo sáng chế. Axit nucleic bao gồm ADN và ARN. Theo một trường hợp được ưu tiên, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa polypeptit theo sáng chế như được xác định ở trên, bao gồm polypeptit tương ứng cho các vùng CDR của chuỗi VH và VL của kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất các cấu trúc ở dạng các plasmit, vectơ, quá trình phiên mã hoặc các caxet biểu hiện chứa ít nhất một polynucleotit nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa một hoặc nhiều cấu trúc nêu trên. Bản thân axit nucleic mã hóa phần tử liên kết đặc hiệu bất kỳ được đề cập này cũng tạo thành một phương án của sáng chế cũng như phương pháp tạo ra phần tử liên kết đặc hiệu này, phương pháp này bao gồm việc biểu hiện axit nucleic mã hóa phần tử này. Việc biểu hiện có thể được thực hiện một cách dễ dàng bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa axit nucleic này trong các điều kiện thích hợp. Sau khi được tạo ra bằng cách biểu hiện, phần tử liên kết đặc hiệu có thể được tách và/hoặc tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ thích hợp, sau đó được sử dụng nếu cần.

Các phần tử liên kết đặc hiệu và các phân tử axit nucleic mã hóa chúng và các vectơ theo sáng chế có thể được cung cấp ở dạng được phân lập và/hoặc tinh chế, ví dụ ra khỏi môi trường tự nhiên của chúng, ở dạng gần như tinh khiết hoặc đồng nhất, hoặc trong trường hợp là axit nucleic, thì chúng dạng không hoặc gần như không chứa axit nucleic hoặc các gen có nguồn gốc không phải là trình tự mã hóa polypeptit có chức năng mong muốn. Axit nucleic theo sáng chế có thể bao gồm ADN hoặc ARN và có thể được tổng hợp hoàn toàn hoặc một phần.

Các hệ thống dùng để tách dòng và biểu hiện polypeptit trong các tế bào vật chủ khác nhau là đã biết. Các tế bào vật chủ thích hợp bao gồm vi khuẩn, tế bào động vật có vú, nấm men và các hệ thống baculovirut. Các dòng tế bào của động vật có vú đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để biểu hiện polypeptit khác loài bao gồm các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HeLa, các tế bào thận chuột đồng

mới sinh, các tế bào sắc tố ở chuột NSO và nhiều loại tế bào khác. Tế bào vật chủ thường, được ưu tiên là tế bào vi khuẩn *E. coli*.

Việc biểu hiện kháng thể và các mảnh kháng thể trong tế bào tiền nhân như *E. coli* là đã được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này. Liên quan đến vấn đề này, xem tài liệu, ví dụ: Pluckthun, A. Bio/Technology 9:545-551 (1991). Việc biểu hiện trong các tế bào nhân chuẩn trong môi trường nuôi cấy cũng đã được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dưới dạng một tùy chọn để tạo ra phần tử liên kết đặc hiệu, xem tổng quan gần đây nhất, ví dụ Raff, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576; Trill J. J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6:553-560.

Các vectơ thích hợp có thể được chọn hoặc tạo cấu trúc, chứa các trình tự thích hợp điều hòa, bao gồm các trình tự khởi đầu, các trình tự kết thúc, các trình tự polyadenyl hóa, các trình tự tăng cường, các gen đánh dấu và các trình tự khác nếu thích hợp. Các vectơ có thể là các plasmit, virut, ví dụ thực bào, hoặc phagemit, nếu thích hợp. Cụ thể hơn, xem tài liệu, ví dụ: Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nhiều kỹ thuật và quy trình thao tác kỹ thuật axit nucleic là đã biết, ví dụ trong việc tạo ra các cấu trúc axit nucleic, tạo đột biến, giải trình tự, chuyển ADN vào tế bào và biểu hiện gen, và phân tích protein, đã được mô tả chi tiết trong tài liệu: Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế. Một trường hợp khác đề xuất phương pháp đưa axit nucleic này vào tế bào chủ. Phương pháp này có thể sử dụng kỹ thuật bất kỳ hiện có. Đối với các tế bào nhân chuẩn, các kỹ thuật thích hợp có thể bao gồm kỹ thuật chuyển nhiễm bằng cách sử dụng canxi phosphat, DEAE-Dextran, điện xung, chuyển nhiễm thông qua liposom và tải nạp bằng cách sử dụng retrovirut hoặc virut khác, ví dụ virut đậu mùa hoặc, đối với tế bào côn trùng, là các baculovirut. Đối với các tế bào vi khuẩn, các kỹ thuật thích hợp có thể bao gồm biến kỹ thuật nạp bằng cách sử dụng canxi clorua, điện xung và chuyển nhiễm bằng cách sử dụng thể thực khuẩn.

Sau khi đưa axit nucleic vào có thể tiến hành hoặc cho phép biểu hiện axit nucleic, ví dụ bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện để biểu hiện gen được chuyển đó.

Theo một phương án, axit nucleic theo sáng chế được nhập vào hệ gen (ví dụ, nhiễm sắc thể) của tế bào vật chủ. Việc nhập vào hệ gen này có thể được thúc đẩy bằng cách lồng các trình tự có tác dụng thúc đẩy quá trình tái tổ hợp với hệ gen, theo các kỹ thuật chuẩn.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bao gồm bước sử dụng cấu trúc như được đề cập ở trên trong hệ thống biểu hiện để biểu hiện phần tử liên kết đặc hiệu hoặc polypeptit đã nêu.

Như đã được nêu ở trên, sáng chế cũng đề cập đến phân tử ADN tái tổ hợp hoặc gen được tách dòng, hoặc biến thể thoái biến của nó, mã hóa phần tử liên kết đặc hiệu, nghĩa là kháng thể hoặc mảnh của nó, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và 4; 129 và 134; 22 và 27; 32 và 37; và/hoặc 42 và 47, tốt hơn là phân tử axit nucleic, cụ thể là phân tử ADN tái tổ hợp hoặc gen được tách dòng, mã hóa phần tử liên kết hoặc kháng thể có trình tự nucleotit hoặc bổ trợ với trình tự ADN mã hóa cho một trong số các trình tự này.

Một dấu hiệu khác của sáng chế là việc biểu hiện các trình tự ADN được mô tả ở đây. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các trình tự ADN có thể được biểu hiện bằng cách liên kết một cách có kiểm soát với trình tự kiểm soát sự biểu hiện trong vectơ biểu hiện thích hợp và sử dụng vectơ biểu hiện này để biến nạp vào vật chủ đơn tế bào thích hợp.

Tất nhiên việc liên kết một cách có kiểm soát trình tự ADN theo sáng chế với trình tự kiểm soát sự biểu hiện, bao gồm, nếu ngay từ đầu không phải là một phần của trình tự ADN, cung cấp codon khởi đầu, ATG, trong khung đọc mở chính xác ngược dòng của trình tự ADN.

Rất nhiều tổ hợp vật chủ/vectơ biểu hiện có thể được sử dụng để biểu hiện các trình tự ADN theo sáng chế. Các vectơ biểu hiện, ví dụ, có thể cấu tạo từ các mảnh của các trình tự nhiễm sắc thể, không phải là nhiễm sắc thể và tổng hợp. Các vectơ thích hợp bao gồm các dẫn xuất của SV40 và cũng biết các plasmit vi khuẩn, ví dụ, các plasmit của *E. coli*, col El, pCRl, pBR322, pMB9 và các dẫn xuất của chúng, các plasmit như RP4; các ADN thể thực khuẩn, ví dụ, có nhiều dẫn xuất của thể thực khuẩn X, ví dụ, NM989, và AND thể thực khuẩn khác, ví dụ, M13 và ADN thể thực khuẩn sợi đơn; các plasmit nấm men như plasmit 2u hoặc các dẫn xuất của nó; các

vectơ hữu ích trong các tế bào nhân chuẩn, như các vectơ hữu ích trong tế bào côn trùng hoặc các tế bào động vật có vú; các vectơ thu được từ hỗn hợp bao gồm các plasmit và các ADN thể thực khuẩn, như các plasmit đã được cải biến để sử dụng ADN thể thực khuẩn hoặc các trình tự kiểm soát sự biểu hiện; và v.v..

Trình tự bất kỳ trong số các trình tự kiểm soát biểu hiện, nghĩa là trình tự kiểm soát sự biểu hiện trình tự ADN liên kết một cách có kiểm soát với nó, có thể hữu dụng trong các vectơ nêu trên để biểu hiện các trình tự ADN theo sáng chế. Các trình tự kiểm soát sự biểu hiện hữu dụng thích hợp bao gồm, ví dụ các trình tự khởi đầu sớm hoặc muộn của SV40, CMV, virut đậu mùa, virut polyoma hoặc adenovirut, hệ thống *lac*, hệ thống *trp*, hệ thống *TAC*, hệ thống *TRC*, hệ thống *LTR*, các trình tự khởi đầu và trình tự chỉ huy của phage λ, các trình tự kiểm soát của protein vỏ fd, vùng khởi động cho 3-phosphoglyxerat kinaza hoặc các enzym phân hủy glycol khác, các trình tự khởi đầu của axit phosphataza (ví dụ, Pho5), các trình tự khởi đầu của các yếu tố ghép cặp nấm men, và các trình tự khác đã biết để kiểm soát sự biểu hiện của các gen trong tế bào tiền nhân hoặc nhân chuẩn hoặc các virut của chúng, và hỗn hợp khác của chúng.

Nhiều tế bào vật chủ đơn bào cũng hữu ích trong việc biểu hiện các trình tự ADN theo sáng chế. Các vật chủ này có thể bao gồm các vật chủ nhân chuẩn và tiền nhân đã biết, như các chủng vi khuẩn *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, nấm như nấm men, và các tế bào động vật, như các tế bào CHO, YB/20, NSO, SP2/0, Rl.l, B-W và L-M, các tế bào thận của khỉ xanh Nam Mỹ (African Green Monkey) (ví dụ, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, và BMT10), các tế bào côn trùng (ví dụ, Sf9), và các tế bào người và các tế bào thực vật trong môi trường nuôi cấy mô.

Cần hiểu rằng không phải tất cả các vectơ, trình tự kiểm soát sự biểu hiện và vật chủ có chức năng hoàn toàn tương đương để biểu hiện các trình tự ADN theo sáng chế. Không phải các tất cả vật chủ đều có chức năng hoàn toàn giống nhau nếu trong cùng một hệ thống biểu hiện. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng lựa chọn các vectơ, trình tự kiểm soát sự biểu hiện, vật chủ thích hợp mà không cần quá nhiều thử nghiệm bất hợp lý để thực hiện được việc biểu hiện mong muốn mà không vượt quá phạm vi của sáng chế. Ví dụ, trong việc lựa chọn vectơ, phải xem xét vật chủ vì vectơ phải thực hiện được chức năng của mình trong vật chủ đó. Số bản sao của vectơ, khả năng kiểm soát số bản sao này, và sự biểu hiện

protein bất kỳ khác được mã hóa bởi vectơ này, như các gen đánh dấu kháng sinh cũng cần được xem xét.

Khi lựa chọn trình tự kiểm soát sự biểu hiện cũng thường phải xem xét nhiều yếu tố. Các yếu tố này bao gồm, ví dụ độ mạnh tương đối của hệ thống đó, khả năng kiểm soát, và tính tương hợp của nó với trình tự ADN hoặc gen cụ thể được biểu hiện, cụ thể là trong mối liên hệ với các cấu trúc tiềm năng thứ cấp. Các vật chủ đơn bào thích hợp sẽ được chọn bằng cách xem xét, ví dụ tính tương hợp của chúng với vectơ được chọn, đặc tính tiết của chúng, khả năng gấp nếp protein một cách chính xác của chúng, và các yêu cầu về quá trình lên men của chúng, cũng như độc tính đối với vật chủ tạo ra sản phẩm được mã hóa bởi các trình tự ADN được biểu hiện, và khả năng tinh chế các sản phẩm biểu hiện.

Dựa trên việc xem xét các yếu tố này và các yếu tố khác nữa mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có khả năng thiết kế ra rất nhiều hỗn hợp vectơ/trình tự kiểm soát sự biểu hiện/vật chủ sẽ biểu hiện trình tự ADN theo sáng chế khi lên men hoặc trong môi trường nuôi cấy động vật với quy mô lớn.

Cũng được dự định là trường hợp các chất tương tự phần tử liên kết đặc hiệu có thể được tạo thành từ các trình tự nucleotit của phức protein/tiểu đơn vị thu được thuộc phạm vi của sáng chế. Các chất tương đồng, như các mảnh, có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách phân cắt nguyên liệu chứa phần tử liên kết đặc hiệu bằng enzym pepsin. Các chất tương đồng khác, như các đột biến, có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến điểm trực tiếp trình tự mã hóa phần tử liên kết đặc hiệu theo quy trình chuẩn. Các chất tương đồng này thể hiện "hoạt tính của phần tử liên kết đặc hiệu" như các tiểu phân tử, bất kể chúng thực hiện chức năng như các trình tự khởi đầu hoặc các chất ức chế, mà có thể được xác định bằng các thử nghiệm *in vivo* và/hoặc *in vitro* đã biết.

Như đã đề cập ở trên, trình tự ADN mã hóa phần tử liên kết đặc hiệu có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hơn là được tách dòng. Trình tự ADN này có thể được thiết kế có các codon thích hợp cho trình tự của axit amin phần tử liên kết đặc hiệu. Thông thường, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ chọn các codon được ưu tiên cho vật chủ được dự định sử dụng nếu trình tự này được sử dụng để biểu hiện. Trình tự hoàn chỉnh được cấu tạo từ các oligonucleotit chồng lấn được tạo ra bằng các phương pháp chuẩn và được lắp ráp thành trình tự mã hóa hoàn chỉnh. Xem, ví dụ tài

liệu: Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984).

Các trình tự ADN tổng hợp cho phép dễ dàng tạo ra cấu trúc gen, các gen này sẽ biểu hiện các chất tương đồng hoặc "các đột biến" của phần tử liên kết đặc hiệu. Theo cách khác, ADN mã hóa các đột biến có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến điểm trực tiếp các gen hoặc các ADN bổ trợ của phần tử liên kết đặc hiệu tự nhiên, và các đột biến có thể được trực tiếp tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp polypeptit thông thường.

Phương pháp tổng quát để tạo ra các axit amin không có trong tự nhiên vào một vị trí cụ thể trong protein đã được mô tả trong tài liệu: Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244:182-188 (April 1989). Phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra chất tương đồng chứa các axit amin không có trong tự nhiên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra các oligonucleotit đối nghĩa và các ribozym mà có thể được sử dụng để can thiệp vào việc biểu hiện EGFR ở cấp độ dịch mã (trong quá trình dịch mã). Phương pháp này sử dụng axit nucleic đối mã và các ribozym để phong bế quá trình dịch mã của ARN thông tin đặc hiệu, ARN thông tin bằng axit nucleic đối mã hoặc phân cắt nó bằng ribozym.

Các axit nucleic đối mã là các phân tử ADN hoặc ARN bổ trợ với ít nhất là một phần của phân tử ARN thông tin đặc hiệu (xem tài liệu: Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988.). Trong tế bào, Các axit nucleic đối mã lai với ARN thông tin, tạo thành một phân tử mạch kép. Tế bào không dịch mã ARN thông tin thành dạng mạch kép. Do đó, các axit nucleic đối mã can thiệp vào sự biểu hiện ARN thông tin thành protein. Các oligome chứa khoảng 15 nucleotit và các phân tử lai với codon khởi đầu AUG sẽ đặc biệt hiệu quả do chúng dễ tổng hợp và chắc chắc tạo ra ít vấn đề hơn các phân tử lớn khi đưa chúng vào trong các tế bào sản xuất. Các phương pháp sử dụng axit nucleic đối mã (phương pháp đối mã) đã được sử dụng để ức chế sự biểu hiện của nhiều gen *in vitro* (Marcus-Sekura, 1988; Hambor et al., 1988).

Các ribozym là các phân tử ARN có khả năng phân cắt đặc hiệu các phân tử ARN mạch đơn khác theo cách mà ở một mức độ nào nó nó tương đương với các enzym endonucleaza cắt giới hạn ADN. Các ribozym được phát hiện ra từ việc quan

sát thấy rằng các ARN thông tin có khả năng cắt bỏ các intron của bản thân chúng. Bằng cách cải biến trình tự nucleotit của những ARN này, các nhà nghiên cứu có khả năng xử lý kỹ thuật các phân tử nhận biết các trình tự nucleotit đặc hiệu trong phân tử ARN và phân cắt nó (Cech, 1988.). Do chúng đặc hiệu với trình tự nên chỉ các ARN thông tin có các trình tự cụ thể mới bị bất hoạt.

Các tác giả sáng chế đã xác định được hai loại ribozym, loại tetrahymena và loại "đầu búa" (Hasselhoff and Gerlach, 1988). Ribozym loại tetrahymena nhận biết trình tự bốn bazơ, trong khi đó loại "đầu búa" nhận biết trình tự có từ 11 đến 18 bazơ. Trình tự nhận biết càng dài thì khả năng nhận biết đặc hiệu các loại ARN thông tin đích càng lớn. Do đó, các ribozym loại "đầu búa" được ưu tiên hơn các ribozym loại tetrahymena trong việc bất hoạt các loại ARN thông tin đặc hiệu, và ribozym nhận biết các trình tự có 18 bazơ được ưu tiên hơn so với ribozym nhận biết các trình tự ngắn hơn.

Do đó, các trình tự ADN được mô tả theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra các chất đối kháng phân tử đối mã, và các ribozym phân cắt các ARN thông tin cho EFGR và các phối tử của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ ràng hơn bằng cách tham khảo các ví dụ bên dưới. Các ví dụ này được cung cấp nhằm mục đích minh họa cho sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế. Các ví dụ sau đây cũng được đưa ra nhằm minh họa một cách đầy đủ hơn các phương án được ưu tiên của sáng chế, tuy nhiên, cần hiểu rằng, đó không phải là cách nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Tạo ra và phân lập kháng thể

Các dòng tế bào

Đối với các phương pháp phân tích miễn dịch và tính đặc hiệu, một số dòng tế bào, tự nhiên hoặc được chuyển nhiễm bằng gen bình thường, kiểu dại hoặc gen "wtEGFR" hoặc ΔGen EGFR mang đột biến loại bỏ Δ2-7 được sử dụng: dòng tế bào nguyên bào sợi ở chuột nhắt NR6, $NR6_{\Delta EGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng ΔEGFR) và $NR6_{wtEGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng wtEGFR), dòng tế bào u thần kinh đệm ở người U87MG (biểu hiện các mức wtEGFR nội sinh thấp), $U87MG_{wtEGFR}$ (được chuyển

nhiễm bằng wtEGFR), U87MG$_{\Delta EGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng ΔEGFR), và ở người dòng tế bào caxinom tế bào vảy A431 (biểu hiện wtEGFR ở mức cao).

Đối với các phép phân tích miễn dịch và tính đặc hiệu, một số dòng tế bào, tự nhiên hoặc được chuyển nhiễm bằng gen bình thường, kiểu dại hoặc gen "wtEGFR" hoặc ΔGen EGFR mang đột biến loại bỏ de2-7 hoặc Δ2-7 được sử dụng: dòng tế bào nguyên bào sợi ở chuột nhắt NR6, NR6$_{\Delta EGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng ΔEGFR) và NR6$_{wtEGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng wtEGFR), dòng tế bào u thần kinh đệm ở người U87MG (biểu hiện các mức wtEGFR nội sinh thấp), U87MG$_{wtEGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng wtEGFR), U87MG$_{\Delta EGFR}$ (được chuyển nhiễm bằng ΔEGFR), và ở người dòng tế bào caxinom tế bào vảy A431 (biểu hiện wtEGFR ở mức cao). Các dòng tế bào NR6, NR6$_{\Delta EGFR,}$, và NR6 $_{wtEGFR}$ đã được mô tả trước đây (Batra et al. (1995) Epidermal Growth Factor Ligand-independent, Unregulated, Cell-Transforming Potential of a Naturally Occurring Human Mutant EGFRvIII Gene. Cell Growth Differ. 6(10): 1251-1259). Dòng tế bào NR6 thiếu EGFR nội sinh bình thường. (Batra et al., 1995). Dòng tế bào U87MG và các thể chuyển nhiễm đã được mô tả trước đây (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-7731).

Dòng tế bào hình sao U87MG ((Ponten, J. and Macintyre, E. H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 74, 465-86) biểu hiện các mức wtEGFR nội sinh thấp, được gây nhiễm bằng retrovirut chứa d2-7 EGFR để tạo ra dòng tế bào U87MG.Δ2-7 (Nishikawa et al., 1994). Dòng tế bào U87MG.wtEGFR sau khi chuyển nhiễm được tạo ra như được mô tả trong tài liệu: Nagane et al. (1996) Cancer Res. 56, 5079-5086. Trong khi các tế bào U87MG biểu hiện EGFR ở mức khoảng $1x10^5$, thì các tế bào U87MG.wtEGFR lại biểu hiện EGFR ở mức khoảng $1x10^6$ và do đó, giả tình huống được thấy là có sự khuếch đại gen. Dòng tế bào B trưởng thành (pro-B) ở chuột nhắt, BaF/3, không biểu hiện các phân tử bất kỳ đã biết liên quan đến EGFR, cũng được chuyển nhiễm bằng de2-7 EGFR. tạo ra dòng tế bào BaF/3. Δ2-7 (Luwor et al. (2004) The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR, Oncogene 23: 6095-6104). Các tế bào caxinom tế bào vảy ở người

A431 thu được từ ATCC (Rockville, MD). Dòng tế bào caxinom biểu bì A431 đã được mô tả trước đây (Sato et al. (1987) Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. Methods Enzymol. 146, 63-81).

Tất cả các dòng tế bào trên được nuôi cấy trong DMEM/F-12 cùng với GlutaMAX™ (Life Technologies, Inc., Melbourne, Australia and Grand Island, NY) được bổ sung 10% FCS (CSL, Melbourne, Australia); 2 mM Glutamin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), và penixilin/streptomyxin (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Ngoài ra, dòng tế bào U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR được giữ trong 400 mg/ml genetixin (Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Australia). Các dòng tế bào này được sinh trưởng ở 37°C trong không khí không biến đổi chứa 5% CO_2.

Các thuốc thử

Peptit tiếp hợp đồng nhất D2-7 EGFR có trình tự axit amin: LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO:13). Peptit tiếp hợp đồng nhất được biotin hóa (Biotin-LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO:5) và LEEKKGNYVVTDH-Biotin (SEQ ID NO:6)) từ de2-7 EGFR được tổng hợp bằng phương pháp hóa học Fmoc chuẩn và độ có độ tinh khiết (> 96%) được xác định bằng HPLC đảo pha và phương pháp phân tích phổ khối (Auspep, Melbourne, Australia).

Các kháng thể được sử dụng trong nghiên cứu

Để so sánh các kháng thể theo sáng chế với các thuốc thử khác, các mAb bổ sung được sử dụng trong các nghiên cứu của các tác giả sáng chế. Các thuốc thử này là mAb528 của wtEGFR (Sato et al. (1983) Mol. Biol. Med. 1(5), 511-529) và DH8.3, được tạo ra dựa trên peptit tổng hợp mở rộng đến trình tự tiếp hợp của đột biến loại bỏ Δ2-7 EGFR. Kháng thể DH8.3 (IgGl), có tính đặc hiệu với d2-7 EGFR, đã được mô tả trước đây ((Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537-43,1995) và thu được sau khi gây miễn dịch chuột nhắt bằng peptit tiếp hợp đồng nhất được phát hiện thấy trong de2-7 EGFR (Hills et al., 1995).

Kháng thể 528, một kháng thể nhận biết cả de2-7 lẫn EGFR kiểu dại, đã được mô tả trước đây (Masui et al. (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic

mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res. 44, 1002-7) và được tạo ra tại Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research (Melbourne, Australia) bằng cách sử dụng tế bào lai (ATCC HB-8509) thu được từ American Type Culture Collection (Rockville, MD). Kháng thể đa dòng SC-03 là kháng thể đa dòng của thỏ được tinh chế theo ái lực và được phát triển dựa trên peptit đầu carboxyl của EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Tạo ra kháng thể

Dòng tế bào nguyên bào sợi ở chuột nhắt $NR6_{\Delta EGFR}$ được sử dụng làm kháng nguyên. Các tế bào lai được tạo ra bằng cách được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột nhắt BALB/c 5 lần liên tiếp với thời gian giữa các lần gây miễn dịch là từ 2 đến 3 tuần, với mật độ 5×10^5 - 2×10^6 tế bào trong tá dược. Tá dược Freund hoàn chỉnh được sử dụng cho lần tiêm thứ nhất. Sau đó, tá dược Freund không hoàn chỉnh (Difco ™, Voigt Global Distribution, Lawrence, KS) được sử dụng. Các tế bào lá lách từ chuột nhắt đã gây miễn dịch được dung hợp với dòng tế bào u tủy ở chuột nhắt SP2/0 (Shulman et al. (1978) Nature 276:269-270). Dịch nổi của dòng tế bào mới tạo được sàng lọc bằng thử nghiệm hấp thụ hồng cầu xác định hoạt tính với dòng tế bào NR6, $NR6_{wtEGFR}$, và $NR6_{\Delta EGFR}$ và sau đó, được phân tích bằng thử nghiệm hấp thụ hồng cầu với các dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm ở người U87MG, $U87MG_{wtEGFR}$, và $U87_{\Delta EGFR}$. Sau đó dịch nổi chứa tế bào lai được chọn này được thử nghiệm bằng thẩm tách Western và được phân tích thêm bằng hóa mô miễn dịch. Các mAb mới có mô hình phản ứng như mong đợi được tinh chế.

Năm tế bào lai được tạo ra và ba dòng, 124 (IgG2a), 806 (IgG2b) và 1133 (IgG2a) bước đầu được chọn để tiếp tục phân tích đặc tính với hiệu giá cao (1:2500) bằng $NR6_{\Delta EGFR}$ và giá trị cơ sở thấp trên các tế bào NR6 và $NR6_{wtEGFR}$ trong thử nghiệm ngưng kết hồng cầu hình hoa thị. Dòng thứ tư, 175 (IgG2a) sau đó được tiếp tục phân tích đặc tính và được thử nghiệm riêng trong Ví dụ 23, bên dưới. Trong phép phân tích ngưng kết hồng cầu sau đó, các kháng thể này không thể hiện hoạt tính (dịch nổi không pha loãng ≤ 10%) với dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm tự nhiên U87MG và $U87MG_{wtEGFR}$ ở người, nhưng lại phản ứng mạnh với $U87MG_{\Delta EGFR}$; hoạt tính kém hơn được thấy đối với A431. Ngược lại, trong phân tích FACS, 806 không phản ứng với U87MG tự nhiên và $U87MG_{\Delta EGFR}$ được nhuộm màu mạnh và với

$U87MG_{wtEGFR}$ với mức độ kém hơn, điều này thể hiện kháng thể 806 liên kết với cả ΔEGFR và wtEGFR (xem bên dưới).

Tiếp theo, trong các thử nghiệm thẩm tách Western, mAb124, mAb806 và mAb1133 được phân tích hoạt tính với wtEGFR và ΔEGFR. Các dịch tan bằng chất tẩy được chiết từ $NR6_{\Delta EGFR}$, $U87MG_{\Delta EGFR}$ và từ A431. Cả ba mAb thể hiện mô hình phản ứng tương tự nhau với các dịch tan tế bào nhuộm màu đối với cả protein wtEGFR (170 kDa) lẫn ΔEGFR (140 kDa). mAbR.I, chất thử tham chiếu, đã biết là phản ứng với wtEGFR (Waterfield et al. (1982) J. Cell Biochem. 20(2), 149-161) được sử dụng thay cho mAb528, chất được biết là không phản ứng trong phương pháp thẩm tách Western. mAbR.I. thể hiện là có hoạt tính với EGFR kiểu dại và ΔEGFR. Cả ba dòng mới được tạo ra này đều thể hiện hoạt tính với ΔEGFR và có cường độ yếu hơn so với wtEGFR. DH8.3 chỉ dương tính trong dịch tan của $U87MG_{\Delta EGFR}$ và $NR6_{\Delta EGFR}$.

Phép phân tích hóa mô miễn dịch các dòng 124, 806, và 1133 cũng như các dòng mAb528 và mAbDH8.3 trên các khối u ghép khác loại, U87MG, $U87MG_{\Delta EGFR}$, và A431 được nêu trong Bảng 1. Tất cả các mAb đều thể hiện sự nhuộm màu mạnh trên u ghép khác loài $U87MG_{\Delta EGFR}$. Duy chỉ có mAb528 thể hiện thể hiện hoạt tính yếu trên u ghép khác loài tự nhiên U87MG. Trên các u ghép khác loài A431, mAb528 thể hiện hoạt tính mạnh tương đương nhau. mAb124, mAb806 và mAb1133 thể hiện hoạt tính với hầu hết các tế bào nằm ở đáy của caxinom tế bào vảy của A431 và không phản ứng với các lớp tế bào bên trên hoặc thành phần keratin hóa. DH8.3 âm tính trong u ghép khác loài A431.

Bảng 1

Phân tích hóa mô miễn dịch của các kháng thể 528, DH8.3, và 124, 806 và 1133

Kháng thể	U ghép khác loài $\Delta U87MG_{\Delta EGFR}$	U ghép khác loài A431	U ghép khác loài U87MG (tự nhiên)
mAb528	Dương tính	Dương tính	Dương tính (nhuộm màu tập trung)
mAb124	Dương tính	Dương tính (chủ yếu là các tế bào ở đáy)	-
mAb806	Dương tính	Dương tính (chủ yếu là các tế bào ở đáy)	-
mAb1133	Dương tính	Dương tính (chủ yếu	-

		là các tế bào ở đáy)	
DH8.3	Dương tính	-	-
Nhuộm màu kém do phát hiện thấy kháng thể nội sinh của chuột nhắt.			

Giải trình tự

Vùng biến đổi của chuỗi nặng (variable heavy - VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (variable light - VL) của kháng thể mAb806, mAb124 và mAb1133 được giải trình tự và các vùng CDR của chúng được xác định như sau:

mAb806

VH của mAb806: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:1) và trình tự axit amin, với peptit tín hiệu (SEQ ID NO:2) được nêu trong Fig.14A và Fig.14B, tương ứng (peptit tín hiệu được gạch chân trong Fig.14B). Các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NO: 15, 16, và 17, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân trong Fig.16. Trình tự axit amin của VH của mAb806 không có peptit tín hiệu của mình (SEQ ID NO:11) được nêu trong Fig.16.

VL của mAb806: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:3) và trình tự axit amin, với peptit tín hiệu (SEQ ID NO:4) được nêu trong Fig.15A và Fig.15B, tương ứng (peptit tín hiệu được gạch chân trong Fig.15B). Các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NO: 18, 19, và 20, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân trong Fig.17. Trình tự axit amin của VL của mAb806 không có peptit tín hiệu của mình (SEQ ID NO:11) được nêu trong Fig.17.

mAb124

VH của mAb124: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:21) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:22) được nêu trong Fig.51A và Fig.51B, tương ứng. Các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NO: 23, 24, và 25, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân.

VL của mAb124: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:26) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:27) được nêu trong Fig.51C và Fig.51D, tương ứng. Các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NOS: 28, 29, và 30, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân.

mAb1133

VH của mAb1113: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:31) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:32) được nêu trong Fig.52A và 52B, tương ứng. Các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NOS: 33, 34, và 35, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân.

VL của mAb1133: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:36) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:37) được nêu trong Fig.52C và 52D, tương ứng. Các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NOS: 38, 39, và 40, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân.

Ví dụ 2. Phân tích liên kết của kháng thể với các dòng tế bào bằng FACS

Ban đầu, mAb806 được chọn để xác định thêm đặc tính, như được nêu ở đây và trong các Ví dụ sau đây. mAb124 và mAb1133 cũng được chọn để xác định thêm đặc tính, như được đề cập trong Ví dụ 26 bên dưới, và phát hiện thấy chúng có đặc điểm tương ứng với đặc điểm đặc trưng của mAb806 được đề cập ở đây.

Để xác định tính đặc hiệu của mAb806, phân tích mối liên kết của nó với các tế bào U87MG, U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR bằng phương pháp phân loại tế bào hoạt hóa theo dòng (flow activated cell sorting - FACS). Tóm tắt như sau, đánh dấu các tế bào bằng kháng thể liên quan (10 μg/ml), đó là IgG dê kháng thỏ được dung hợp với chất phát huỳnh quang (tỷ lệ pha loãng 1:100; Calbiochem San Diego, CA, USA; Becton-Dickinson PharMingen, San Diego, CA, US) như đã mô tả trước đây (Nishikawa et al., 1994). Số liệu của FACS thu được trên Coulter Epics Elite ESP bằng cách quan sát tối thiểu là 5,000 trường hợp và phân tích bằng cách sử dụng EXPO (phiên bản 2) cho Windows. Kháng thể không liên quan, IgG2b, được sử dụng làm đối chứng cùng lớp cho mAb806 và kháng thể 528 cũng được sử dụng vì nó nhận biết cả de2-7 lẫn wtEGFR.

Duy chỉ có kháng thể 528 có khả năng nhuộm màu dòng tế bào U87MG gốc (Fig.1), điều này phù hợp với các thông báo trước đây cho rằng các tế bào này biểu hiện wtEGFR (Nishikawa et al, 1994). mAb806 và DH8.3 liên kết với kháng thể đối chứng ở mức tương đương, điều này rõ ràng cho thấy chúng không có khả năng liên kết với thụ thể kiểu dại (Fig.1). Liên kết của kháng thể đối chứng cùng lớp với tế bào

U87MG.Δ2-7 và tế bào U87MG.wtEGFR ở mức tương đương với mức quan sát được đối với tế bào U87MG.

mAb806 nhuộm màu tế bào U87MG.Δ2-7 và tế bào U87MG.wtEGFR, điều này cho thấy mAb806 nhận biết đặc hiệu d2-7 EGFR và sự khuếch đại EGFR (Fig.1). Kháng thể DH8.3 nhuộm màu các tế bào U87MG.Δ2-7, điều này khẳng định rằng kháng thể DH8.3 nhận biết đặc hiệu d2-7 EGFR (Fig.1). Đúng như dự kiến, kháng thể 528 nhuộm màu cả dòng tế bào U87MG.Δ2-7 lẫn dòng tế bào U87MG.wtEGFR (Fig.1). Đúng như dự kiến, kháng thể 528 nhuộm màu tế bào U87MG.Δ2-7 với cường độ lớn hơn so với tế bào gốc vì nó liên kết với cả thụ thể de2-7 và thụ thể kiểu dại cùng được biểu hiện trong các tế bào này (Fig.1). Cũng thu được kết quả tương tự khi sử dụng đồng thời protein A và phương pháp hấp thụ hồng cầu, phương pháp kết hợp này phát hiện IgG trên bề mặt tế bào nhờ sự xuất hiện của protein A được phủ các tế bào hồng cầu của người (nhóm O) liên kết với các tế bào đích. Kháng thể đơn dòng 806 phản ứng với các tế bào U87MG.Δ2-7, nhưng thể hiện hoạt tính không đáng kể (dịch nổi không pha loãng dưới hơn 10%) với các tế bào U87MG biểu hiện EGFR kiểu dại. Quan trọng là, mAb806 cũng liên kết với dòng tế bào BaF/3.Δ2-7, điều này cho thấy việc cùng biểu hiện với wtEGFR không phải là điều kiện cần để tạo ra hoạt tính của mAb806 (Fig.1).

Ví dụ 3. Liên kết của các kháng thể trong các thử nghiệm

Để phân tích thêm tính đặc hiệu của kháng thể mAb806 và kháng thể DH8.3, liên kết của chúng được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Hai loại thử nghiệm ELISA được sử dụng để xác định tính đặc hiệu của các kháng thể này. Trong thử nghiệm đầu tiên, các đĩa được phủ bằng sEGFR (10 μg/ml trong đệm carbonat 0,1M, độ pH=9,2) trong 2 giờ và sau đó, được phong bế bằng albumin huyết thanh người 2% (human serum albumin - HSA) trong PBS. sEGFR là vùng ngoại bào tái tổ hợp (các axit amin 1-621) của EGFR kiểu dại), và được tạo ra như đã mô tả trước đây (Domagala et al. (2000) Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor. Growth Factors. 18, 11-29). Các kháng thể được bổ sung vào các giếng ba lần với nồng độ tăng dần trong HSA 2% trong nước muối đệm phosphat (phosphate-buffered saline - PBS). Kháng thể ở dạng liên kết được phát hiện bằng IgG cừu kháng chuột

nhất dung hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Silenus, Melbourne, Australia) sử dụng ABTS (Sigma, Sydney, Australia) làm cơ chất và độ hấp thụ được đo ở 405 nm.

Cả kháng thể mAb806 và kháng thể 528 đều có đường cong liên kết phụ thuộc vào liều lượng và bão hòa với sEGFR kiểu dại được cố định (Fig.2A). Do peptit tiếp hợp duy nhất được phát hiện thấy trong d2-7 EGFR không nằm trong sEGFR nên mAb806 phải liên kết với epitop nằm trong trình tự EGFR kiểu dại. Mức độ liên kết của kháng thể 528 là thấp hơn so với mức độ liên kết quan sát được đối với mAb806, có thể do nó nhận biết yếu tố xác định cấu hình. Đúng như dự kiến, kháng thể tDH8.3 không liên kết với sEGFR kiểu dại ngay cả khi nồng độ lên đến 10 μg/ml (Fig.2A). Mặc dù sEGFR ở dạng dung dịch ức chế liên kết của kháng thể 528 với sEGFR được cố định theo cách phụ thuộc vào liều lượng, nhưng nó không có khả năng ức chế liên kết của mAb806 (Fig.2B). Điều này cho thấy rằng mAb806 có thể chỉ liên kết với EGFR kiểu dại khi nó được cố định trên các đĩa ELISA, một quy trình mà có thể tạo ra các thay đổi trong cấu hình. Thu được kết quả tương tự khi sử dụng BIAcore, trong đó mAb806 liên kết với sEGFR được cố định, nhưng mAb806 được cố định lại không có khả năng liên kết với sEGFR ở dạng dung dịch (Fig.2C).

Sau khi làm biến tính bằng cách gia nhiệt trong 10 phút ở 95°C, sEGFR ở dạng dung dịch có khả năng ức chế liên kết của mAb806 với sEGFR được cố định (Fig.2C), điều này khẳng định rằng mAb806 có thể liên kết với EGFR kiểu dại trong một số điều kiện nhất định. Điều đáng quan tâm là, sEGFR biến tính không có khả năng ức chế liên kết của kháng thể 528 (Fig.2C), điều này cho thấy kháng thể này nhận biết epitop cấu hình. Kháng thể DH8.3 biểu thị khả năng liên kết với peptit de2-7 EGFR duy nhất theo cách phụ thuộc vào liều lượng và có thể trung hòa (Fig.2D). Cả kháng thể mAb806 lẫn kháng thể 528 đều không liên kết với peptit này, ngay cả khi chúng ở nồng độ cao hơn nồng độ được sử dụng để thu được liên kết trung hòa đối với kháng thể DH8.3, điều này càng cho thấy rằng kháng thể mAb806 không nhận biết yếu tố xác định epitop nằm trong peptit này.

Trong thử nghiệm thứ hai, peptit đặc hiệu de2-7 được biotin hóa (Biotin-LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO:5)) được cho gắn với các đĩa ELISA phủ trước bằng streptavidin (Pierce, Rockford, Illinois). Các kháng thể được cho liên kết và phát hiện như trong thử nghiệm thứ nhất. Cả kháng thể mAb806 lẫn kháng thể 528 đều

không liên kết với peptit này, ngay cả khi chúng ở nồng độ cao hơn nồng độ được sử dụng để thu được liên kết trung hòa của kháng thể DH8.3, điều này càng cho thấy kháng thể mAb806 không nhận biết yếu tố xác định epitop nằm trong peptit này.

Để chứng minh thêm rằng mAb806 nhận biết epitop khác với peptit tiếp hợp, tiến hành thêm một số thử nghiệm. Pepit de2-7 được biotin hóa ở đầu C (LEEKKGNYVVTDH-Biotin (SEQ ID NO:6)) được sử dụng trong các nghiên cứu với mAb806 và mAbL8A4, được tạo ra dựa trên pepit de2-7 (Reist et al. (1995) Cancer Res. 55(19), 4375-4382; Foulon et al. (2000) Cancer Res. 60(16), 4453-4460).

Các thuốc thử được sử dụng trong các nghiên cứu peptit

Peptit tiếp hợp : LEEKKGNYVVTDH-OH (Biosource, Camarillo, CA);

Peptit C: LEEKKGNYVVTDH(K-Biot)-OH (Biosource, Camarillo, CA);

sEGFR : Vùng ngoại bào tan tái tổ hợp thu được từ tế bào CHO (các axit amin 1-621) của EGFR kiểu dại (LICR Melbourne);

mAb806: Kháng thể đơn dòng của chuột nhắt, IgG_{2b} (LICR NYB);

mAbL8A4: Kháng thể đơn dòng của chuột nhắt, IgG_1 (Duke University);

mAb đối chứng cùng lớp, IgG_1;

mAb đối chứng cùng lớp, IgG_{2b}.

Peptit C được cố định trên chip vi cảm biến Streptavidin với mật độ trên bề mặt là 350RU (+/- 30RU). Các loạt pha loãng của các mAb được thử nghiệm hoạt tính với peptit này. Các thử nghiệm phong bế bằng cách sử dụng peptit không được biotin hóa được tiến hành để đánh giá tính đặc hiệu.

mAbL8A4 thể hiện hoạt tính mạnh với Peptit C thậm chí ở các nồng độ kháng thể thấp (6,25 nM) (Fig.2E). mAb806 không thể hiện hoạt tính đặc hiệu có thể phát hiện thấy với Peptit C ở nồng độ kháng thể lên đến 100nM (nồng độ cao nhất được thử nghiệm) (Fig.2E và 2F). Đã kỳ vọng rằng mAbL8A4 sẽ phản ứng với Peptit C do peptit này được sử dụng làm kháng nguyên để tạo ra mAbL8A4. Việc bổ sung Peptit tiếp hợp (không được biotin hóa, 50 µg/ml) làm ức chế hoàn toàn hoạt tính của mAbL8A4 với Peptit C, điều này khẳng định tính đặc hiệu của kháng thể này là đối với epitop của peptit tiếp hợp.

Trong bộ thử nghiệm BIAcore thứ hai, sEGFR được cố định trên chip vi cảm biến CM ở mật độ bề mặt khoảng 4000RU. Các loạt pha loãng của mAb được thử nghiệm hoạt tính với sEGFR.

mAb806 phản ứng mạnh với sEGFR biến tính trong khi đó mAbL8A4 không phản ứng với sEGFR biến tính. Hoạt tính của mAb806 với sEGFR biến tính giảm khi nồng độ kháng thể giảm. Được mong đợi rằng mAbL8A4 không phản ứng với sEGFR do mAbL8A4 được tạo ra sử dụng peptit tiếp hợp làm kháng nguyên và sEGFR không chứa peptit tiếp hợp này.

Các thử nghiệm nhuộm màu miễn dịch thấm điểm (dot-blot) cũng được tiến hành. Các loạt pha loãng của peptit được chấm lên trên PVDF với thể tích 0,5 µl hoặc màng nitroxenluloza. Các màng được phong bế bằng 2% BSA trong PBS, và sau đó, được dò bằng 806, L8A4, DH8.3 và các kháng thể đối chứng. Các kháng thể L8A4 và DH8.3 được liên kết với peptit trên các màng (số liệu không được thể hiện). mAb806 không liên kết với peptit ở các nồng độ mà tại đó L8A4 thể hiện tính liên kết rõ ràng (số liệu không được thể hiện). Các kháng thể đối chứng cũng không liên kết với peptit (cho kết quả âm tính với liên kết peptit).

mAb806 liên kết với wtEGFR trong các dịch tan tế bào sau khi thẩm tách miễn dịch (kết quả không được thể hiện). Đây là sự khác nhau giữa kết quả thu được với kháng thể DH8.3, kháng thể phản ứng với de2-7 EGFR, nhưng không phản ứng với wtEGFR. Do đó, mAb806 có thể nhận biết wtEGFR sau khi bị biến tính, nhưng không nhận biết thụ thể này khi nó ở trạng thái bình thường của mình trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 4. Phân tích Scatchard

Phân tích Scatchard sử dụng tế bào U87MG.Δ2-7 được tiến hành sau khi hiệu chỉnh đối với hoạt tính miễn dịch để xác định ái lực tương đối của từng kháng thể. Các kháng thể đánh dấu bằng ^{125}I (Amrad, Melbourne, Australia) theo phương pháp Chloramine T và hoạt tính miễn dịch được xác định bằng thử nghiệm Lindmo (Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immunol. Methods. 72, 77-89).

Tất cả các thử nghiệm liên kết được tiến hành trong 1% HSA/PBS trên 1-2 × 10^6 tế bào U87MG.Δ2-7 hoặc A431 sống trong 90 phút ở nhiệt độ 4°C trong điều kiện lắc chậm. Một bộ kháng thể được đánh dấu ^{125}I có nồng độ 10 ng/ml được sử dụng trong điều kiện có mặt của kháng thể không được đánh dấu thích hợp với nồng độ tăng. Liên kết không đặc hiệu được xác định khi kháng thể không được đánh dấu có mặt với lượng gấp 10000 lần. Cả mAb806 lẫn kháng thể DH8.3 được đánh dấu phóng xạ ^{125}I đều không liên kết với các tế bào U87MG gốc. Sau khi kết thúc quá trình ủ, rửa các tế bào và đếm kháng thể được đánh dấu ^{125}I ở dạng liên kết bằng cách sử dụng máy đếm gama COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA).

Cả kháng thể mAb806 lẫn kháng thể DH8.3 đều giữ lại được hoạt tính miễn dịch cao khi được iot hóa và thường lớn hơn 90% đối với kháng thể mAb806 và khoảng từ 45 đến 50% đối với kháng thể DH8.3. Kháng thể mAb806 có ái lực đối với thụ thể d2-7 EGFR bằng 1,1 × 10^9 M^{-1} trong khi đó ái lực của kháng thể DH8.3 thấp hơn khoảng 10 lần và bằng 1,0 × 10^8 M^{-1}. Cả hai kháng thể được iot hóa đều không liên kết với các tế bào U87MG gốc. Kháng thể mAb806 nhận biết trung bình 2,4 × 10^5 vị trí liên kết trên mỗi tế bào, và với kháng thể DH8.3, giá trị này là 5,2 × 10^5 vị trí liên kết. Do đó, không chỉ có sự tương đồng lớn về số thụ thể giữa các kháng thể này, mà giống như các báo cáo trước đây đã xác định được 2,5 × 10^5 thụ thể de2-7 trên mỗi tế bào như được xác định bằng kháng thể đặc hiệu de2-7 EGFR khác nhau trên cùng một dòng tế bào (Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xerograft after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 57, 1510-5).

Ví dụ 5. Sự thu nhận các kháng thể bởi tế bào U87MG.Δ2-7

Tỷ lệ thu nhận kháng thể sau khi gắn kết với tế bào đích ảnh hưởng đến cả đặc tính của u đích của nó lẫn các tùy chọn điều trị. Do đó, các tác giả sáng chế kiểm tra sự thu nhận kháng thể mAb806 và kháng thể DH8.3 sau khi gắn kết với các tế bào U87MG.Δ2-7 bằng FACS. Các tế bào U87MG.Δ2-7 được ủ với kháng thể mAb806 hoặc kháng thể DH8.3 (10 μg/ml) trong 1 giờ trong môi trường DMEM ở 4°C. Sau khi rửa, các tế bào được chuyển vào môi trường DMEM đã ủ trước đến 37°C và lấy các từng phần môi trường tại các thời điểm khác nhau sau khi ủ ở 37°C. Quá trình thu nhận bị ngừng ngay sau khi rửa các phần này trong đệm rửa được làm lạnh bằng nước

đá (1% HSA/PBS). Vào thời điểm kết thúc quá trình nêu trên, các tế bào được nhuộm màu bằng FACS như được mô tả ở trên. Tỷ lệ % thu nhận được tính bằng cách so sánh màu nhuộm kháng thể trên bề mặt tại các thời điểm khác nhau so với thời điểm ban đầu bằng cách sử dụng công thức: % kháng thể được thu nhận = (cường độ ánh sáng huỳnh quang trung bình ở thời điểm$_x$ - cường độ ánh sáng huỳnh quang ban đầu)/(cường độ ánh sáng huỳnh quang trung bình ở thời điểm$_0$ - cường độ ánh sáng huỳnh quang ban đầu) × 100. Phương pháp này được chấp thuận trong một thử nghiệm sử dụng kháng thể được iot hóa (mAb806) để xác định mức độ thu nhận như được mô tả trước đây (Huang et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J. Biol. Chem. 272, 2927-35). Sự sai khác giữa tốc độ thu nhận ở các thời điểm khác nhau được so sánh với nhau bằng cách sử dụng phép thử Student-T. Trong toàn bộ sáng chế, số liệu được phân tích ý nghĩa thống kê bằng phép thử Student-T, ngoại trừ các thử nghiệm về khả năng sống sót *in vivo* được phân tích bằng phân tích Wilcoxon.

Cả hai kháng thể đều thể hiện sự thu nhận tương đối nhanh, và đạt đến trạng thái sẵn sàng trong 10 phút đối với mAb806 và 30 phút đối với DH8.3 (Fig.3). Tỷ lệ thu nhận và tổng lượng thu nhận đều cao hơn cao hơn đáng kể đối với DH8.3 (80,5% DH8.3 được thu nhận trong 10 phút so với 36,8% đối với mAb806, $p < 0,01$) và tổng lượng được thu nhận trong 60 phút (93,5% so với 30,4%, $p < 0,001$). mAb806 thể hiện mức thu nhận thấp hơn đáng kể ở 30 và 60 phút so với 20 phút trong tất cả 4 thử nghiệm được tiến hành (Fig.3). Kết quả này cũng được khẳng định sử dụng thử nghiệm thu nhận đối với mAb806 được iot hóa (số liệu không được thể hiện).

Ví dụ 6. Phân tích sự thu nhận kháng thể bằng kính hiển vi điện tử

Dựa trên sự khác biệt của tỷ lệ thu nhận được nêu trên giữa các kháng thể, việc phân tích chi tiết sự di chuyển của kháng thể trong tế bào được tiến hành bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử.

Các tế bào U87MG.Δ2-7 được sinh trưởng trên các khoang tiêu bản được phủ gelatin (Nunc, Naperville, IL) đến khi độ nhập dòng bằng 80% và sau đó, rửa bằng DMEM được làm lạnh bằng nước đá. Các tế bào này sau đó được ủ với kháng thể mAb806 hoặc kháng thể DH8.3 trong DMEM trong 45 phút ở 4°C. Sau khi rửa, các tế

bào được ủ trong 30 phút nữa với IgG kháng chuột nhắt dung hợp với vàng (các hạt 20 nm) (BBInternational, Cardiff, UK) ở 4°C. Sau khi rửa thêm một lần nữa, DMEM/10% PCS đã được ủ trước được bổ sung vào các tế bào nêu trên, được ủ ở 37°C trong các khoảng thời gian khác nhau từ 1 đến 60 phút. Quá trình thu nhận kháng thể được ngừng lại khi bổ sung môi trường được làm lạnh bằng nước đá và các tế bào được cố định bằng glutaraldehyt 2,5% trong PBS/HSA 0,1% và sau đó, được cố định sau trong osmi tetroxit 2,5%. Sau khi loại nước nhờ loạt axeton được chọn lọc, các mẫu được nhúng vào trong nhựa Epon/Araldite, cắt thành các mảnh siêu mỏng bằng thiết bị vi phẫu Reichert Ultracut-S (Leica) và thu gom trên lưới niken. Các mảnh này được nhuộm màu bằng uranyl axetat và chì xitrat trước khi được quan sát trên kính hiển vi điện tử truyền dẫn Philips CM12 ở 80 phép thử Chi-square.

Trong khi kháng thể DH8.3 chủ yếu được thu nhận thông qua các khoang được phủ gelatin thì kháng thể mAb806 dường như chỉ được thu nhận bằng đại ẩm bào (Fig.19). Trong thực tế, phân tích chi tiết 32 khoang được phủ gelatin được tạo thành trong các tế bào được ủ với kháng thể mAb806 cho thấy rằng không có khoang nào chứa kháng thể. Ngược lại, khoảng 20% toàn bộ số khoang được phủ gelatin trong các tế bào được ủ với DH8.3 cho kết quả dương tính với kháng thể, với một số khoang chứa rất nhiều hạt vàng. Phân tích thống kê tổng số hạt vàng có trong các khoang được phủ gelatin phát hiện thấy sự sai khác có có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Sau 20-30 phút, có thể thấy cấu trúc của cả hai kháng thể đều giống về hình thái với lysosom (Fig.19C). Sự có mặt của các mảnh vỡ tế bào trong cấu trúc của chúng cũng phù hợp với bản chất lysosom của chúng.

Ví dụ 7. Phân bố sinh học của các kháng thể trong chuột nhắt trụi lông mang u

Phân bố sinh học của kháng thể mAb806 và kháng thể DH8.3 được sử dụng trong mẫu chuột nhắt trụi lông mang các u ghép khác loài U87MG ở một bên sườn và các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 ở bên sườn còn lại. Như thông báo trước đây cho thấy kháng thể DH8.3 thể hiện mức tạo đích u lớn nhất trong khoảng từ 4 đến 24 giờ nên nghiên cứu này có khoảng thời gian tương đối ngắn (Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537-43).

Các mảnh ghép u khác loại được đưa vào chuột nhắt BALB/c trụi lông bằng cách tiêm dưới da 3×10^6 tế bào U87MG, U87MG.Δ2-7 hoặc A431. Mức biểu hiện de2-7 EGFR trong các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 được duy trì ở mức thích hợp trong suốt thời gian nghiên cứu phân bố sinh học kháng thể như được xác định bằng hóa mô miễn dịch ở các thời điểm khác nhau (số liệu không được thể hiện). Các tế bào A431 giữ lại được hoạt tính với mAb806 của chúng khi chúng được sinh trưởng dưới dạng các u ghép khác loài như được xác định bằng hóa mô miễn dịch. Tế bào U87MG hoặc A431 được tiêm vào một bên sườn từ 7 đến 10 ngày trước khi các tế bào U87MG.Δ2-7 được tiêm vào bên sườn còn lại do tốc độ phát triển quan sát được đối với các u ghép khác loài biểu hiện de2-7 EGFR nhanh hơn. Các kháng thể được đánh dấu phóng xạ và đánh giá hoạt tính miễn dịch như được mô tả ở trên và được tiêm vào chuột nhắt qua đường sau hốc mắt khi các khối u có trọng lượng 100-200 mg. Mỗi con chuột nhắt được nhận hai kháng thể khác nhau (2 μg/ kháng thể): mAb806 được đánh dấu ^{125}I có hoạt tính riêng là 2 μCi và kháng thể DH8.3 hoặc kháng thể 528 được đánh dấu ^{125}I có hoạt tính riêng là 2 μCi. Trừ khi có thông báo nếu không nhóm gồm 5 con sẽ bị giết vào các thời điểm khác nhau sau khi tiêm và lấy mẫu máu bằng cách chích ở tim. Các khối u, gan, lá lách, thận và phổi thu được bằng cách cắt. Tất cả các mô đều được xác định trọng lượng và thử nghiệm hoạt tính ^{125}I và ^{131}I bằng cách sử dụng cửa sổ đếm hai kênh. Số liệu được biểu hiện cho từng kháng thể dưới dạng tỷ lệ % ID/g u được xác định bằng các so sánh với các chuẩn liều lượng được tiêm hoặc được chuyển thành tỷ lệ máu/gan (nghĩa là, % ID/g u chia cho % ID/g máu hoặc gan). Sự sai khác giữa các nhóm được phân tích bằng phép thử Student-T. Sau khi tiêm mAb806 được đánh dấu phóng xạ, một số u được cố định trong formalin, nhúng vào trong parafin, cắt thành các mảnh 5μm và sau đó, cho tiếp xúc với màng tia X (AGFA, Mortsel, Belgium) để xác định vị trí của kháng thể bằng cách chụp ảnh phóng xạ tự ghi.

Liên quan đến tỷ lệ % ID/g u, kháng thể mAb806 đạt mức đỉnh trong các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 là 18,6 % m/g u sau 8 giờ (Fig.4A), cao hơn đáng kể so với cá mô khác, ngoại trừ máu. Trong khi kháng thể DH8.3 cũng thể hiện các mức đỉnh của nó trong u sau 8 giờ, nhưng mức này thấp hơn về mặt thống kê ($p < 0,001$) 8,8% m/g u so với kháng thể mAb806 (Fig.4B). Mức của cả hai kháng thể này giảm dần sau 24 và 48 giờ. Chụp ảnh phóng xạ tự ghi các mảnh mô ghép khác loại U87MG.Δ2-7 được thu

gom 8 giờ sau khi tiêm kháng thể mAb806 chỉ được đánh dấu bằng ^{125}I, cho thấy rõ vị trí của kháng thể đối với u nhìn thấy (Fig.20). Các kháng thể đều không thể hiện đích đặc hiệu là các u ghép khác loài U87MG gốc (Fig.4A và 4B). Liên quan đến tỷ lệ máu/gan, mAb806 thể hiện tỷ lệ này cao nhất sau 24 giờ cả ở máu (tỷ lệ là 1,3) và gan (tỷ lệ là 6,1) (Fig.5A và 5B). Kháng thể DH8.3 có tỷ lệ cao nhất của nó trong máu sau 8 giờ (tỷ lệ là 0,38) và sau 24 giờ trong gan (tỷ lệ là 1,5) (Fig.5 A và 5B), cả hai giá trị này đều thấp hơn đáng kể so với các giá trị thu được đối với mAb806.

Như được mô tả ở trên, mức kháng thể mAb806 trong u đạt đỉnh sau 8 giờ từ khi dùng. Trong khi đỉnh này đạt được khá sớm so với nhiều kháng thể khác có đích là u, nhưng điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu sử dụng các kháng thể đặc hiệu với de2-7 EGFR, tất cả các kháng thể này đều đạt mức đỉnh trong khoảng từ 4 đến 24 giờ sau khi tiêm với liều dùng tương tự (Hills et al., 1995; Reist et al., 1997; Reist et al. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 56, 4970-7). Thực vậy, không giống như các thông báo trước đó, thời điểm 8 giờ cũng đã được dự kiến là kháng thể có đích là u sẽ sớm đạt đỉnh. Tỷ lệ % ID/g u cho thấy đối với kháng thể mAb806 là tương tự như như tỷ lệ % ID/g u được thông báo đối với các kháng thể khác đặc hiệu với de2-7 EGFR khi sử dụng các kỹ thuật iot hóa chuẩn (Hills et al., 1995; Huang et al., 1997; Reist et al. (1995) Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xerograft. Cancer Res. 55, 4375-82).

Việc đạt đỉnh sớm có thể do hai lý do: Lý do thứ nhất đó là, các khối u biểu hiện d2-7 EGFR, bao gồm các tế bào U87MG đã gây nhiễm sinh trưởng cực nhanh giống như các mảnh ghép u khác loại. Do đó, thậm chí ngay trong một khoảng thời gian tương đối ngắn được sử dụng trong các nghiên cứu phân bố sinh học này, kích cỡ của u tăng đến mức (khối lượng tăng 5-10 lần trong 4 ngày) mà % ID/g u giảm so với các khối u phát triển chậm. Lý do thứ hai đó là, trong khi sự thu nhận kháng thể mAb806 diễn ra tương đối chậm so với kháng thể DH8.3, nhưng nó vẫn là nhanh so với nhiều hệ kháng thể/kháng nguyên u khác. Các kháng thể được thu nhận trải qua quá trình phân giải protein rất nhanh với các sản phẩm sau khi phân giải được tế bào tiết ra ngoài (Press et al. (1990) Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor

cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. Cancer Res. 50, 1243-50). Quá trình thu nhận, phân giải và tiết ra này làm giảm lượng kháng thể được iot hóa được giữ lại trong tế bào. Do đó, việc thu nhận các kháng thể có mức thấp hơn trong đích so với các đối tác không thu nhận của chúng. Số liệu thu được từ phân tích bằng kính hiển vi điện tử được thể hiện ở đây cho thấy kháng thể mAb806 sau khi được thu nhận được vận chuyển nhanh chóng đến các lysosom, tại đây quá trình phân hủy nhanh có thể xảy ra. Điều này phù hợp với việc loại bỏ iot nhanh chóng khỏi tế bào.

Kháng thể đơn dòng L8A4 đã được mô tả trước đây định hướng vào peptit tiếp hợp duy nhất được phát hiện thấy trong d2-7 EGFR, có tập tính tương tự với kháng thể mAb806 (Reist et al. (1997) *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. Nucl. Med. Biol. 24, 639-47). Sử dụng các tế bào U87MG được chuyển nhiễm bằng d2-7 EGFR, kháng thể này có tỷ lệ thu nhận tương tự (35% sau 1 giờ so với 30% sau 1 giờ đối với mAb806) và thể hiện mức có thể so sánh trong đích *in vivo* khi sử dụng các nguyên bào sợi 3T3 được chuyển nhiễm bằng de2-7 EGFR (đỉnh 24 % ID/g u sau 24 giờ so với 18 % ID/g u sau 8 giờ đối với mAb806) (Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor u ghép khác loài sau labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 57, 1510-5).

Điều đáng quan tâm là, thời gian lưu *in vivo* của kháng thể này trong các mảnh ghép u khác loại tăng lên khi kháng thể này được đánh dấu bằng N-suxinimidyl 5-iodo-3-pyridin carboxylat (Reist et al., 1997). Nhóm giả được đánh dấu này mang điện dương ở độ pH của lysosom và do đó, nó làm tăng thời gian lưu trong tế bào (Reist et al. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 56, 4970-7). Thời gian được tăng cường có thể hữu ích khi xem xét kháng thể để điều trị miễn dịch phóng xạ và phương pháp này có thể được sử dụng để làm tăng thời gian lưu của kháng thể mAb806 được iot hóa hoặc các mảnh của nó.

Ví dụ 8. Liên kết của kháng thể mAb806 với các tế bào có sự khuếch đại EGFR

Để xác định xem liệu kháng thể mAb806 có thể nhận biết EGFR được biểu hiện trong các tế bào có sự khuếch đại của gen thụ thể hay không, tiến hành phân tích liên kết của nó với các tế bào A431. Như đã mô tả trước đây, các tế bào A431 là các tế bào caxinom tế bào vảy ở người và biểu hiện wtEGFR ở mức cao. Liên kết của kháng thể mAb806 với các tế bào A431 thấp, tuy nhiên lại được tạo ra với mức cao, được quan sát bằng phép phân tích FACS (Fig.6). Kháng thể DH8.3 không liên kết với các tế bào A431, điều này cho thấy liên kết của kháng thể mAb806 không phải là kết quả của việc biểu hiện de2-7 EGFR ở mức thấp (Fig.6). Như mong đợi, kháng EGFR kháng thể 528 thể hiện sự nhuộm màu các tế bào A431 mạnh (Fig.6). Dựa trên kết quả này, liên kết của kháng thể mAb806 với các tế bào A431 được phân tích đặc tính bằng phân tích Scatchard. Trong khi liên kết của kháng thể mAb806 được iot hóa thấp tương đương, nhưng nó có thể thu được số liệu phù hợp đối với Scatchard. Giá trị trung bình của ba thử nghiệm này cho giá trị ái lực là $9,5 \times 10^7$ M^{-1} đối với $2,4 \times 10^5$ thụ thể/tế bào. Do đó, ái lực đối với thụ thể này thấp hơn khoảng 10 lần so với ái lực đối với d2-7 EGFR. Ngoài ra, kháng thể mAb806 dường như chỉ nhận biết một phần nhỏ của EGFR được phát hiện thấy trên bề mặt các tế bào A431. Kháng thể 528 xác định khoảng 2×10^6 thụ thể/tế bào và phù hợp với rất nhiều nghiên cứu khác (Santon et al. (1986) Effects of epidermal growth factor receptor concentration trên uigenicity of A431 cells in nude mice. Cancer Res. 46, 4701-5).

Để đảm bảo rằng kết quả này không chỉ giới hạn đối với dòng tế bào A431, hoạt tính của kháng thể mAb806 được xác định đối với 2 dòng tế bào khác có sự khuếch đại gen EGFR. Cả dòng tế bào HN5 ở đầu và cổ (Kwok TT and Sutherland RM (1991) Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. Br. J. Cancer. 64, 251-4) và dòng tế bào ung thư vú MDA-468 (Filmus et al. (1985) MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 898-905) đã được thông báo là chứa nhiều bản sao của gen EGFR. Phù hợp với các thông báo này, kháng thể 528 thể hiện sự nhuộm màu mạnh đối với cả hai dòng tế bào (Fig.21). Như đối với dòng tế bào A431, kháng thể mAb806 nhuộm màu mạnh đối với cả hai dòng tế bào, nhưng ở mức độ thấp hơn so với mức độ quan sát được đối với kháng thể 528 (Fig.21). Do đó, liên kết của mAb806 không hoàn toàn bị hạn chế ở các

tế bào A431, nhưng dường như là quan sát chung đối với các tế bào có sự khuếch đại gen EGFR.

Việc nhận biết sEGFR kiểu dại bởi mAb806 rõ ràng cần có sự biến tính của thụ thể ở một mức độ nào đó để lộ ra epitop. Mức độ biến tính cần chỉ là rất nhỏ thậm chỉ là độ hấp thụ sEGFR kiểu dại trên bề mặt nhựa tạo ra khả năng liên kết mạnh của mAb806 trong các thử nghiệm ELISA. Do mAb806 chỉ liên kết với khoảng 10% EGFR trên bề mặt của các tế bào A431 nên có khả năng suy luận rằng tập con của các thụ thể có thể có cấu hình bị thay đổi tương tự như cấu hình bị thay đổi do biến thể cắt bỏ d2-7 EGFR gây ra. Thực vậy, mức biểu hiện cực cao của EGFR thông qua sự khuếch đại gen trong các tế bào A431 có thể làm cho một số thụ thể được xử lý không chính xác dẫn đến cấu hình bị thay đổi. Điều đáng quan tâm là, phương pháp thẩm tách miễn dịch bán định lượng các dịch tan của tế A431 bằng kháng thể mAb806 thể hiện rằng nó có thể nhận biết hầu hết các thụ thể A431 EGF sau khi SDS-PAGE và chuyển thấm tách Western. Kết quả này hỗ trợ thêm lý luận rằng mAb806 liên kết với một tập hợp thụ thể trên bề mặt của các tế bào A431 có cấu hình bị thay đổi. Những quan sát này trong các tế bào A431 phù hợp với số liệu hóa mô miễn dịch thể hiện rằng mAb806 liên kết với các u thần kinh đệm có sự khuếch đại gen EGFR. Do mAb806 hoàn toàn không liên kết với các tế bào U87MG gốc (hoàn toàn âm tính) nên dường như hiện tượng này có thể được giới hạn ở các tế bào có hiện tượng khuếch đại EGFR mặc dù mức thụ thể "bị biến tính" trên bề mặt của các tế bào U87MG có thể thấp hơn mức phát hiện được. Tuy nhiên, không chắc chắn rằng khi mAb806 được iot hóa thì nó sẽ không liên kết đặc hiệu với các cụm tế bào U87MG chứa tới 1×10^7 tế bào.

Ví dụ 9. Hướng đích tế bào A431 in vivo bằng kháng thể mAb806

Nghiên cứu phân bố sinh học thứ hai được tiến hành với mAb806 để xác định xem liệu nó có thể có đích là các mảnh ghép u khác loại A431 hay không. Nghiên cứu này được tiến hành trong một khoảng thời gian dài hơn để thu được nhiều thông tin hơn liên quan đến việc hướng đích cho u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 bằng mAb806, có trong tất cả đối tượng chuột nhắt được sử dụng làm đối chứng dương. Ngoài ra, kháng thể 528 kháng EGFR được sử dụng làm đối chứng dương cho các u ghép khác loài A431, do nghiên cứu trước đây đã cho thấy việc tạo đích cho các tế bào A431 phát

triển ở chuột nhắt trụi lông bằng kháng thể mAb806 tuy cho kết quả thấp nhưng cũng rất đáng kể (Masui et al. (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res. 44, 1002-7).

Trong 48 giờ đầu, kháng thể mAb806 thể hiện hầu hết các đặc tính giống nhau như các đặc tính được quan sát thấy trong các thử nghiệm đầu tiên (Fig.7A so với Fig.4A). Đối với giá trị % ID/g u, mức mAb806 trong các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 giảm dần sau 24 giờ nhưng vẫn giữ ở mức cao hơn mức được phát hiện thấy trong mô bình thường. Mức hấp thụ kháng thể mAb806 ở các u ghép khác loài A431 thấp tương đương, tuy nhiên giá trị % ID/g u tăng lên một chút trong 24 giờ đầu, điều này không quan sát thấy ở các mô thông thường như gan, lá lách, thận và phổi (Fig.7A). Mức hấp thụ kháng thể 528 rất thấp ở cả hai loại u ghép khác loài khi được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ % ID/g u (Fig.7B), một phần là do sự thanh thải của kháng thể này khỏi máu diễn ra nhanh hơn. Chụp ảnh phóng xạ tự ghi các lát cắt mô ghép khác loại A431 được thu gom 24 giờ sau khi tiêm mAb 806 chỉ được đánh dấu ^{125}I, cho thấy vị trí của kháng thể ở u nhìn thấy xung quanh vùng ngoại biên của u và không có ở vùng trung tâm hoại tử (Fig.23). Liên quan đến tỷ lệ u/máu, mAb806 đạt đỉnh ở 72 giờ đối với các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và 100 giờ đối với Các u ghép khác loài A431 (Fig.8A, B). Mặc dù tỷ lệ u/máu của mAb806 không bao giờ vượt qua 1,0 đối với u A431, nhưng nó lại không tăng trong toàn bộ thời gian thử nghiệm (Fig.8B) và cao hơn tất cả mô được xét nghiệm (số liệu không được thể hiện), điều này thể hiện mức hướng đích thấp.

Tỷ lệ u/máu của kháng thể 528 thể hiện profin tương tự với kháng thể mAb806 mắc dù ghi nhận được các mức cao hơn ở các u ghép khác loài A431 (Fig.8A, B). Kháng thể mAb806 có tỷ lệ u/gan đạt đỉnh 7,6 ở các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 ở 72 giờ, điều này cho thấy rõ ràng là các khối u này hấp thu nhiều hơn so với mô bình thường (Fig.8C). Tỷ lệ u/gan khác của mAb806 tương tự với tỷ lệ u/gan quan sát được trong gan (số liệu không được thể hiện). Kháng thể mAb806 có tỷ lệ u/gan đạt đỉnh 2,0 ở các u ghép khác loài A431 ở 100 giờ, điều này một lần nữa cho thấy sự ưu tiên hấp thu không đáng kể ở u so với mô bình thường (Fig.8D).

Ví dụ 10. Các nghiên cứu trị liệu

Hoạt lực của kháng thể mAb806 được đánh giá trên hai mô hình ghép khác loại đó là mẫu phòng ngừa bệnh và mô hình điều trị u đã được ghép.

Các mẫu u ghép khác loại

Phù hợp với các báo cáo trước đây (Nishikawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91(16), 7727-7731), Các tế bào U87MG được chuyển nhiễm bằng de2-7 EGFR phát triển nhanh hơn nhiều so với các tế bào gốc và các tế bào U87MG được chuyển nhiễm bằng wtEGFR. Do đó, không có thể nuôi cấy cả hai loại tế bào này trên cùng một con chuột nhắt.

Các tế bào u (3×10^6) trong 100 ml PBS được chủng dưới da vào cả hai bên sườn của chuột nhắt trụi lông từ 4 đến 6 tuần tuổi (Animal Research Centre, Western Australia, Australia). Hoạt lực điều trị của kháng thể mAb806 được nghiên cứu trên cả mẫu phòng ngừa lẫn điều trị u đã được ghép. Trong mẫu phòng ngừa, 5 con có hai u ghép khác loài được xử lý bằng cách cho dùng trong màng bụng 1 hoặc 0,1 mg kháng thể mAb806 hoặc tá dược (PBS) bắt đầu vào ngày trước khi chủng tế bào u. Việc điều trị được tiếp tục với tổng số liều dùng là 6, 3 lần một tuần trong 2 tuần. Đối với mô hình điều trị u đã được ghép, việc điều trị được bắt đầu khi các khối u đạt thể tích trung bình là 65 ± 6,42 mm^3 (U87MG.Δ2-7), 84 ± 9,07 mm3 (U87MG), 73 ± 7,5 mm^3 (U87MG.wtEGFR) hoặc 201 ± 19,09 mm^3 (các khối u A431). Thể tích u (mm^3) được xác định sử dụng công thức (chiều dài × chiều rộng^2)/2, trong đó chiều dài là trục dài nhất và chiều rộng là số đo của các góc vuông góc với chiều dài (Clark et al. (2000) Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when được kết hợp với Taxol chemotherapy. Clin. Cancer Res. 6, 3621-3628). Số liệu được thể hiện dưới dạng thể tích trung bình của u ± độ lệch chuẩn đối với mỗi nhóm được điều trị. Phân tích thống kê được tiến hành ở các thời điểm nhất định sử dụng phân tích Student-T. Các con vật bị giết sau khi các mảnh ghép u khác loại đạt thể tích vào khoảng 1,5 cm^3 và các khối u này được cắt và mang đi xét nghiệm mô học. Dự án nghiên cứu này được Animal Ethics Committee của Austin và Repatriation Medical Centre chấp thuận.

Xét nghiệm mô học đối với các mảnh ghép u khác loại

Các mảnh ghép u khác loại được cắt và chia đôi. Một nửa được cố định trong 10% formalin/PBS trước khi được nhúng vào parafin. Sau đó, cắt lấy 4 mảnh cỡ

micron và nhuộm màu bằng haematoxylin và eosin (H&E) để xét nghiệm mô học thông thường. Nửa còn lại được nhúng vào hợp chất OCT Tissue Tek® (Sakura Finetek, Torrance, CA), đông lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C. Cắt lấy các mảnh đông lạnh mỏng (5 micron) và cố định trong axeton được làm lạnh bằng nước đá trong 10 phút, tiếp đó làm khô trong không khí trong 10 phút. Phong bế các lát cắt này trong chất thử phong bế protein (Lipshaw Immunon, Pittsburgh U.S.A.) trong 10 phút và sau đó, được ủ với kháng thể thứ nhất được biotin hóa (1 mg/ml), trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (RT). Tất cả các kháng thể đều được biotin hóa bằng cách sử dụng modun biotin hóa protein ECL (Amersham, Baulkham Hills, Australia), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi rửa bằng PBS, ủ các lát cắt này với phức streptavidin – peroxidaza của cây cải ngựa trong 30 phút nữa (Silenus, Melbourne, Australia). Sau khi rửa lần cuối bằng PBS, cho các lát cắt này tiếp xúc với cơ chất 3-amino-9-etylcarbozol (AEC) (axit axetic 0,1M, natri axetat 0,1M, AEC 0,02M (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)) với sự có mặt hydro peroxit trong 30 phút. Rửa lại các lát cắt bằng nước và nhuộm đối màu bằng hematoxylin trong 5 phút và đếm.

Hoạt lực của kháng thể mAb806 trong mẫu phòng ngừa

Kháng thể mAb806 được xác định hoạt lực trên u U87MG và u U87MG.Δ2-7 trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài. Kháng thể hoặc tá dược được dùng trong màng bụng (i.p) một ngày trước khi chủng u và 3 lần/tuần trong 2 tuần. Kháng thể mAb806 không ảnh hưởng đến sự phát triển các mảnh ghép u khác loại U87MG gốc, mà biểu hiện wtEGFR, ở liều dùng 1 mg/1 lần tiêm (Fig.9A). Ngược lại, kháng thể mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 theo cách phụ thuộc liều dùng (Fig.9B). Vào ngày thứ 20, khi các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u là 1637 ± 178,98 mm^3 đối với nhóm đối chứng, về mặt thống kê nhỏ hơn 526 ± 94.74 mm^3 đối với nhóm được nhận 0,1 mg/1 lần tiêm ($p < 0,0001$) và 197 ± 42,06 mm^3 đối với nhóm được nhận 1 mg/1 lần tiêm ($p < 0,0001$). Các đối tượng ở nhóm điều trị bị giết vào ngày thứ 24, tại thời điểm này thể tích trung bình của u là 1287 ± 243,03 mm^3 đối với nhóm điều trị được dùng 0,1 mg/1 lần tiêm và 492 ± 100,8 mm^3 đối với nhóm được nhận 1 mg/1 lần tiêm.

Hoạt lực của kháng thể mAb806 trong mẫu điều trị u ghép khác loài đã hình thành

Dựa trên hoạt lực của kháng thể mAb806 trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài, khả năng ức chế sự phát triển các mảnh ghép u khác loại đã được ghép của nó

được đánh giá. Kháng thể điều trị là như được mô tả trong mẫu phòng ngừa ngoại trừ thời điểm khi các khối u đạt thể tích trung bình là 65 ± 6,42 mm^3 đối với các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và 84 ± 9,07 mm^3 đối với các u ghép khác loài U87MG gốc. Một lần nữa thấy rằng kháng thể mAb806 không ảnh hưởng đến sự phát triển của các u ghép khác loài U87MG gốc ở liều dùng 1 mg/1 lần tiêm (Fig.10A). Ngược lại, mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 theo cách phụ thuộc liều dùng (Fig.10B). Vào ngày thứ 17, một ngày trước khi các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u là 935 ± 215,04 mm^3 đối với nhóm đối chứng, 386 ± 57,51 mm^3 đối với nhóm được nhận 0,1 mg/1 lần tiêm ($p < 0,01$) và 217 ± 58,17 mm^3 đối với nhóm được nhận 1 mg/1 lần tiêm ($p < 0,002$).

Để xác định xem liệu tác dụng ức chế sự phát triển quan sát được ở kháng thể mAb806 chỉ xuất hiện ở các tế bào biểu hiện de2-7 EGFR hay không, hoạt lực của nó đối với các u ghép khác loài U87MG.wtEGFR được xác định trong mô hình điều trị u đã được ghép. Các tế bào này đóng vai trò làm mẫu cho các khối u có sự khuếch đại gen EGFR mà không biểu hiện de2-7 EGFR. Việc điều trị bằng kháng thể mAb806 bắt đầu khi các khối u đạt thể tích trung bình là 73 ± 7,5 mm^3. Kháng thể mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển các u ghép khác loài U87MG.wtEGFR đã được ghép so với các khối u đối chứng được điều trị bằng tá dược (Fig.10C). Vào ngày các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u là 960 ± 268,9 mm^3 đối với nhóm đối chứng và 468 ± 78,38 mm^3 đối với nhóm được điều trị bằng liều dùng 1 mg/1 lần tiêm ($p < 0,04$).

Phân tích mô học và hóa mô miễn dịch các khối u đã được ghép

Để đánh giá sự khác nhau về mặt mô học có thể có giữa u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và u ghép khác loài U87MG.wtEGFR được điều trị bằng kháng thể mAb806 và đối chứng (thu nhận vào ngày thứ 24 và 42, tương ứng), các lát cắt u sau khi được cố định trong formalin, nhúng vào trong parafin và được nhuộm màu bằng H&E. Các vùng bị hoại tử có thể phát hiện thấy ở cả u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 (thu nhận vào thời điểm 3 ngày sau khi quá trình điều trị kết thúc), và u ghép khác loài U87MG.wtEGFR (thu nhận vào thời điểm 9 ngày sau khi quá trình điều trị kết thúc) được điều trị bằng kháng thể mAb806. Kết quả này phù hợp với các quan sát ở một số mảnh ghép u khác loại (n=4). Tuy nhiên, kết quả phân tích các lát cắt từ các u ghép khác loài được điều trị bằng đối chứng không phát hiện ra các vùng bị hoại tử như đã

thấy khi điều trị bằng kháng thể mAb806. Các lát cắt từ các u ghép khác loài U87MG được điều trị bằng kháng thể mAb806 hoặc đối chứng cũng được nhuộm màu bằng H&E và cho thấy không có sự khác nhau về khả năng sống sót của tế bào giữa hai nhóm, điều này càng minh chứng cho giả thiết rằng liên kết của kháng thể mAb806 làm giảm khả năng sống sót/hoạt tử của tế bào ở các u ghép khác loài.

Phân tích hóa mô miễn dịch đối với các lát cắt của u ghép khác loài U87MG, U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR được tiến hành để xác định các mức biểu hiện de2-7 và wtEGFR sau khi điều trị bằng kháng thể mAb806. Các lát cắt này được thu nhận vào ngày thứ 24 và 42 như trên, và được nhuộm màu miễn dịch bằng kháng thể 528 hoặc kháng thể 806. Như mong đợi, kháng thể 528 nhuộm màu tất cả các lát cắt từ u ghép khác loài mà không biểu hiện sự giảm cường độ rõ rệt giữa u được điều trị và u đối chứng. Kết quả nhuộm màu các lát cắt U87MG không thể phát hiện được bằng kháng thể mAb806, tuy nhiên có thể thấy được sự nhuộm màu này đối với các lát cắt thu được u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR. Không có sự khác biệt giữa cường độ màu nhuộm bằng kháng thể mAb806 giữa các mảnh ghép đối chứng và u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR, điều này chỉ ra rằng việc điều trị bằng kháng thể không làm giảm mức biểu hiện de2-7 hoặc wtEGFR.

Điều trị u ghép khác loài A431 bằng kháng thể mAb806

Để chứng minh rằng tác dụng kháng u của kháng thể mAb806 không chỉ giới hạn ở các tế bào U87MG, kháng thể này được sử dụng cho chuột nhắt có u ghép khác loài A431. Các tế bào này có gen EGFR được khuếch đại và biểu hiện khoảng 2×10^6 thụ thể/tế bào. Như được đề cập ở trên, kháng thể mAb806 liên kết với khoảng 10% EGFR nêu trên và có đích là u ghép khác loài A431. Kháng thể mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển của u ghép khác loài A431 khi được xét nghiệm trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài được mô tả ở trên (Fig.11A). Vào ngày thứ 13, khi các động vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u đạt $1385 \pm 147{,}54$ mm^3 ở nhóm đối chứng và $260 \pm 60{,}33$ mm^3 đối với nhóm điều trị được tiêm 1mg/1 lần tiêm ($p < 0{,}0001$).

Trong một thử nghiệm độc lập, việc sử dụng liều lượng 0,1 mg kháng thể mAb cũng ức chế đáng kể sự phát triển của u ghép khác loài A431 trong mẫu phòng ngừa.

Dựa trên hiệu lực của mAb806 trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài A431, khả năng ức chế sự phát triển u ghép khác loài đã được ghép của nó được xét nghiệm.

Việc điều trị bằng kháng thể là được mô tả trong mẫu phòng ngừa ngoại trừ việc xét nghiệm này không được bắt đầu cho đến khi các khối u đạt thể tích trung bình là 201 ± 19,09 mm^3. Kháng thể mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển các u ghép khác loài đã được ghép (Fig.11B). Vào ngày thứ 13, khi các động vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u là 1142 ± 120,06 mm^3 đối với nhóm đối chứng và 451 ± 65,58 mm^3 nhóm điều trị được tiêm 1mg/1 lần tiêm ($p < 0,0001$).

Tóm lại, các nghiên cứu trị liệu bằng kháng thể mAb806 được mô tả theo sáng chế cho thấy rõ ràng là kháng thể ức chế sự phát triển của u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 theo cách phụ thuộc vào liều dùng. Ngược lại, kháng thể này không ức chế sự phát triển của u ghép khác loài U87MG gốc mặc dù thực tế là chúng vẫn biểu hiện wtEGFR *in vivo*. Kháng thể mAb806 không chỉ làm giảm đáng kể thể tích của u ghép khác loài mà nó cũng làm giảm đáng kể sự hoạt tử bên trong u. Đây là báo cáo đầu tiên cho thấy việc sử dụng thành công kháng thể này trong điều trị *in vivo* đối với u thần kinh đệm ghép khác loại sự biểu hiện de2-7 EGFR ở người.

Sự khuếch đại gen EGFR đã được thông báo đối với một số u khác nhau và được quan sát thấy ở khoảng 50% u thần kinh đệm (Voldberg et al., 1997). Người ta đã cho rằng sự biểu hiện muộn quá mức của EGFR được điều chỉnh thông qua sự khuếch đại gen thụ thể có thể tạo ra ưu thế phát triển bằng cách tăng cường dẫn truyền tín hiệu nội bào và sự sinh trưởng của tế bào (Filmus et al., 1987). Dòng tế bào U87MG được chuyển nhiễm bằng wtEGFR để tạo ra tế bào u thần kinh đệm mô phỏng quá trình khuếch đại gen EGFR. Việc điều trị u ghép khác loài U87MG.wtEGFR đã được ghép bằng mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển của các u này. Do đó, kháng thể mAb806 cũng điều chỉnh hoạt tính kháng u *in vivo* trên các tế bào có sự khuếch đại gen EGFR. Điều đáng quan tâm là, kháng thể mAb806 ức chế sự phát triển của u ghép khác loài U87MG.wtEGFR kém hiệu quả hơn so với u U87MG.Δ2-7. Điều này có thể phản ảnh một thực tế rằng kháng thể mAb806 có ái lực thấp hơn đối với gen EGFR được khuếch đại và chỉ liên kết với một phần nhỏ các thụ thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Tuy nhiên, cần chú ý rằng mặc dù tác động nhỏ đến thể tích của u ghép khác loài U87MG.wtEGFR, nhưng việc điều trị bằng kháng thể mAb806 tạo ra các vùng hoại tử rộng trong các u ghép khác loài này.

Để loại trừ khả năng kháng thể mAb806 chỉ điều chỉnh ức chế các dòng tế bào thu được từ U87MG, các tác giả sáng chế thử nghiệm hoạt lực của kháng thể này trên các u ghép khác loài A431. Đây là dòng tế bào thu được từ caxinom tế bào vảy có lượng gen EGFR đáng kể được khuếch đại cả *in vitro* lẫn *in vivo*. Việc điều trị u ghép khác loài A431 bằng kháng thể mAb806 cũng ức chế đáng kể sự phát triển của u ở cả mẫu phòng ngừa lẫn mẫu điều trị u đã được ghép, điều này cho thấy tác dụng kháng u của kháng thể mAb806 không chỉ bị hạn chế ở các dòng tế bào U87MG đã gây nhiễm.

Ví dụ 11. Điều trị kết hợp các u ghép khác loài A431 bằng kháng thể mAb806 và AG1478

Tác dụng kháng u của kháng thể mAb806 khi kết hợp với AG1478 được thử nghiệm trên chuột nhắt có u ghép khác loài A431. AG1478 (4- (3-Cloanilino)-6,7-dimetoxyquinazolin) là một chất ức chế có hoạt lực và tính chọn lọc của enzym EGFR kinaza so với HER2-neu và kinza thụ thể yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu (platelet-derived growth factor receptor kinase) (Calbiochem Cat. No. 658552). Ba mẫu đối chứng bao gồm: điều trị chỉ bằng tá dược, tá dược + chỉ có kháng thể mAb806, và tá dược + chỉ có AG1478. Kết quả được minh họa trong Fig.12. 0,1 mg kháng thể mAb806 được dùng 1 ngày trước khi ghép u khác loại và 1, 3, 6, 8 và 10 ngày sau khi ghép u khác loại. 400 µg AG1478 được dùng vào 0, 2, 4, 7, 9, và 11 ngày sau khi ghép u khác loại.

Cả AG1478 và mAb806, khi được dùng riêng lẻ, đều làm giảm đáng kể thể tích của u. Tuy nhiên, khi được dùng kết hợp, tác dụng làm giảm thể tích u tăng lên rất nhiều.

Ngoài ra, liên kết của mAb806 với EGFR của các tế bào A431 được đánh giá khi có mặt hoặc không có mặt AG1478. Các tế bào được đặt trong môi trường không chứa huyết thanh qua đêm, sau đó được xử lý bằng AG1478 trong 10 phút ở 37°C, rửa hai lần bằng PBS, sau đó làm tan trong Triton 1% và các dịch tan tế bào được chuẩn bị bằng cách ly tâm trong 10 phút ở 12.000g. Sau đó, đánh giá hoạt tính của kháng thể mAb806 có trong dịch tan tế bào nêu trên bằng thử nghiệm ELISA theo phiên bản cải tiến được như mô tả trong: Schooler and Wiley, Analytical Biochemistry 277, 135-142 (2000). Các đĩa được phủ bằng 10 µg/ml kháng thể mAb806 trong PBS/EDTA qua đêm ở nhiệt độ phòng và sau đó, rửa hai lần. Sau đó, các đĩa này được phong bế bằng

10% albumin huyết thanh/PBS trong 2 giờ ở 37°C và rửa hai lần. Dịch tan tế bào sau khi pha loãng 1:20 lần được bổ sung vào 10% albumin huyết thanh/PBS trong 1 giờ ở 37°C, sau đó rửa bốn lần. Kháng thể kháng EGFR (SC-03; Santa Cruz Biotechnology Inc.) trong 10% albumin huyết thanh/PBS được cho phản ứng trong 90 phút ở nhiệt độ phòng, đĩa nêu trên được rửa bốn lần, và bổ sung kháng thể HRP kháng thỏ (pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 nếu do Silenus cung cấp) trong 10% albumin huyết thanh/PBS và giữ 90 phút ở nhiệt độ phòng, rửa bốn lần, và hiện màu bằng cách sử dụng ABTS làm cơ chất. Kết quả là phát hiện thấy liên kết của kháng thể mAb806 tăng lên đáng kể khi có mặt AG1478 với các lượng tăng dần (Fig.13).

Ví dụ 12. Hoạt tính miễn dịch ở các tế bào u thần kinh đệm ở người chưa xuất hiện kiểu hình đối với trạng thái EGFR

Do phát hiện thấy sự biểu hiện, khuếch đại và đột biến EGFR với mức cao ở các u thần kinh đệm, nên tiến hành nghiên cứu chi tiết hóa mô miễn dịch để đánh giá tính đặc hiệu của kháng thể 806 ở các khối u không phải là các u ghép khác loài. Một bảng gồm 16 loại u thần kinh đệm được phân tích bằng hóa mô miễn dịch. Bảng này gồm 16 loại u thần kinh đệm được tạo ra trước bằng RT-PCR, đó là u có sự khuếch đại EGFR kiểu dại và u biểu hiện de2-7 EGFR. Trong đó 6 loại u chỉ biểu hiện bản sao wtEGFR, 10 có sự khuếch đại gen wtEGFR với 5 loại u chỉ biểu hiện bản sao EGFR kiểu dại, và 5 loại u cùng biểu hiện bản sao của EGFR kiểu dại và bản sao gen de2-7.

Phân tích hóa mô miễn dịch được tiến hành bằng cách sử dụng các lát cắt 5mm của mô đông lạnh được đặt trên các tiêu bản mô học và được cố định trong 10 phút trong axeton lạnh. Kháng thể thứ nhất ở dạng liên kết được phát hiện bằng kháng thể ngựa kháng chuột nhắt được biotin hóa, sau đó bằng phản ứng phức avidin-biotin. Diaminobenzidin tetra hydroclorua (DAB) được sử dụng làm chất tạo màu. Mức phản ứng hóa mô miễn dịch trong các mô được ước tính bằng kính hiển vi quang học và được phân cấp theo số tế bào có phản ứng miễn dịch với số gia là 25% như sau:

Tập trung = nhỏ hơn 5%

+ = 5-25%

++ = 25-50%

+++ = 50-75%

++++ = > 75%

Kháng thể 528 thể hiện hoạt tính mạnh ở tất cả các khối u, trong khi đó DH8.3 chỉ nhuộm màu miễn dịch đối với các khối u biểu hiện d2-7 EGFR (Bảng 2). Phù hợp với các quan sát trước đây trong FACS và các thử nghiệm rối loạn, kháng thể mAb806 không phản ứng với u thần kinh đệm biểu hiện bản sao của wtEGFR từ các gen EGFR không được khuếch đại (Bảng 2). Mô hình hoạt tính này của mAb806 tương tự như mô hình quan sát được ở các nghiên cứu trên u ghép khác loài và điều này một lần nữa cho thấy rằng kháng thể này nhận biết de2-7 EGFR và EGFR được khuếch đại nhưng không nhận biết wtEGFR khi nó được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Bảng 2

Hoạt tính miễn dịch của kháng thể mAbs528, kháng thể DH8.3 và kháng thể 806 trên u thần kinh đệm chưa xuất hiện kiểu hình, có mặt EGFR kiểu dại và de2-7 EGFR đột biến và khuếch đại EGFR

Khuếch đại EGFR	Biểu hiện de2-7 EGFR	Kháng thể 528	Kháng thể DH8.3	Kháng thể 806
	Không	++++	-	-
	Không	++++	-	-*
	Không	++++	-	-
	Không	++	-	-
	Không	+++	-	-
	Không	++++	-	-
Có	Không	++++	-	++++
Có	Không	++++	-	+
Có	Không	++++	-	+++
Có	Không	++++	-	++++
Có	Không	++++	-	+-++++
Có	Có	++++	++++	++++
Có	Có	++++	++++	++++
Có	Có	++++	++++	++++
Có	Có	++++	++++	++++
Có	Có	++++	++	++

* nhuộm màu tập trung

Ví dụ 13. Hoạt tính miễn dịch EGFR trong mô bình thường

Để xác định xem d2-7 EGFR có được biểu hiện ở mô bình thường hay không, nghiên cứu hóa mô miễn dịch với kháng thể mAb806 và kháng thể DH8.3 được tiến hành trên một bảng gồm 25 mô. Kết quả cho thấy không phát hiện được hoạt tính miễn dịch mạnh với kháng thể mAb806 hoặc hợp chất DH83 trong mô bất kỳ được thử nghiệm, điều này cho thấy rằng d2-7 EGFR không có mặt trong các mô thông thường (Bảng 3). Có một chút thay đổi về màu nhuộm trong amidan đối với kháng thể mAb806 mà chỉ bị hạn chế ở các lớp tế bào đáy của biểu bì và các tế bào vảy ở niêm mạc của màng trong. Trong nhau thai, phát hiện thấy có sự nhuộm màu miễn dịch không thường xuyên biểu mô trong lá nuôi phôi. Điều đáng quan tâm là, hai mô biểu hiện mức wtEGFR nội sinh cao đó là gan và da, không thể hiện hoạt tính mAb806 bất kỳ đáng lưu ý. Không quan sát thấy hoạt tính đối với các mẫu gan, và chỉ thể hiện hoạt tính yếu và hội tụ không đồng nhất thỉnh thoảng được phát hiện thấy (không lớn hơn 10% tất cả các mẫu được nghiên cứu) trong các tế bào sừng đáy trong mẫu da và trong biểu mô vảy của niêm mạc amidan, điều này cho thấy rằng kháng thể này không liên kết với wtEGFR được biểu hiện đáng kể trên bề mặt tế bào (Bảng 3). Tất cả các mô đều cho kết quả dương tính với wtEGFR (nghĩa là, biểu hiện wtEGFR) như được chứng minh bằng sự nhuộm màu phổ biến được thấy với kháng thể 528 (Bảng 3).

Bảng 3

Hoạt tính của các kháng thể 528, DH8.3 và 806 trên các mô thông thường

Mô	Kháng thể 528	Kháng thể DH8.3	Kháng thể 806
Thực quản	dương tính	-	-
Dạ dày	dương tính	-	-
Tá tràng	dương tính	-	-
Ruột non/tá tràng	dương tính	-	-
Ruột	dương tính	-	-
Gan	dương tính	-	-
Các tuyến nước bọt (tuyến mang tai)	dương tính	-	-
Thận	dương tính	-	-
Bàng quang niệu đạo	dương tính	-	-
Tuyến tiền liệt	dương tính	-	-
Tinh hoàn	dương tính	-	-

Mô	Kháng thể 528	Kháng thể DH8.3	Kháng thể 806
Niệu đạo (cx/khúc nội phôi bì)	dương tính	-*	-
Ống dẫn trứng	dương tính	-	-
Buồng trứng	dương tính	-	-
Vú	dương tính	-*	-
Nhau thai	dương tính	-	-
Thần kinh ngoại biên	dương tính	-	-
Cơ xương	dương tính	-	-
Tuyến giáp	dương tính	-	-
Hạch lympho	dương tính	-	-
Lá lách	dương tính	-	-
Amidan	dương tính	-	- đôi khi. hoạt tính yếu của lớp đáy biểu mô vảy
Tim	dương tính	-	-
Phổi	dương tính	-	-
Da	dương tính	-	- đôi khi. hoạt tính yếu của lớp đáy biểu mô vảy

* nhuộm màu phân tán ở mô khác nhau

Ví dụ 14. Hoạt tính miễn dịch với EGFR ở các khối u khác nhau

Mức phản ứng đối với de2-7 EGFR ở loại u khác nhau được xét nghiệm bằng cách sử dụng một mảng gồm 12 u ác tính khác nhau. Kháng thể 528 thể hiện sự nhuộm màu nhìn chung là đồng đều trong nhiều u được phân tích ngoại trừ u hắc sắc tố và u tinh. Khi có mặt, hoạt tính miễn dịch của DH8.3 bị hạn chế ở tế bào u tập trung không thường xuyên, điều này cho thấy DH8.3 có hoạt tính yếu nếu có sự biểu hiện de2-7 EGFR bất kỳ ở các khối u bên ngoài não sử dụng hệ thống phát hiện này (Bảng 4). Cũng có sự nhuộm màu tập trung các mạch máu và sự nhuộm màu khuếch tán mô liên kết bởi DH8.3 ở một số u (Bảng 4). Sự nhuộm màu này phụ thuộc chặt chẽ vào nồng độ kháng thể được sử dụng và được coi là hoạt tính cơ sở không đặc hiệu. Kháng thể mAb806 thể hiện sự nhuộm màu (cho kết quả dương tính) đối với 64% u đầu và cổ và 50% caxinom phổi (Bảng 4). Hoạt tính yếu của mAb806 không được phát hiện thấy ở

bất cứ nơi đâu khác ngoại trừ trong các u niệu đạo mà với 30% trường hợp cho kết quả dương tính.

Do ung thư đầu và cổ và phổi cho kết quả âm tính với hoạt tính của kháng thể DH8.3 được quan sát thấy với mAb ở các u này có thể đi kèm với sự khuếch đại gen EGFR.

Bảng 4.Các kháng thể đơn dòng 528, DH8.3 và 806 trên mảng u

U	Kháng thể 528	Kháng thể DH8.3	Kháng thể 806
U hắc sắc tố ác tính di căn	0/10	0/10	0/10
Bàng quang niệu đạo (tcc, sqcc, adeno)	10/10 (7x++++,2x++++,1x+)	0/10*	3/10* (2x++++,1x++)
Tuyến vú	6/10 (3x++++,3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
Đầu + cổ ung thư (sqcc)	11/11 (1x+++-10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++,3x+++,1x+)
Phổi (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 (10x++++-1x+++)	0/12*	6/12 (3x++++ 3x+++)
Sacom ác tính ở cơ trơn	5/5 (4x++++,1x+)	0/5	0/5
U ác tính ở tế bào mỡ	5/5 (2x + 3x +++)	0/5	0/5*
U ác tính ở xương đùi	4/5* (4x ++++)	0/5	0/5*
U mô bào sợi ác tính Mfh	4/5*	0/5*	0/5*
Caxinom ruột	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
U tinh	1/10*	1/10*	0/10
Buồng trứng (ống dẫn trứng)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5

*nhuộm màu tập trung

Ví dụ 15. Hoạt tính miễn dịch ở u thần kinh đệm của người không chọn lọc đối với trạng thái EGFR

Để khẳng định tính đặc hiệu đặc trưng và để đánh giá hoạt tính của mAb806, tiến hành so sánh kháng thể 528 với kháng thể DH8.3 trong một mảng gồm 46 u thần kinh đệm không chọn lọc trước về tình trạng EGFR của chúng. Kháng thể 528 phản ứng mạnh và đều dương tính ở tất cả các mẫu ngoại trừ hai mẫu (số 27 và 29) (44/46, 95,7%). Hai trường hợp này cũng âm tính đối với mAb806 và mAbDH8.3. Kháng thể mAb806 cho kết quả dương tính ở 27/46 (58,7%) trường hợp, 22 mẫu biểu hiện hoạt tính miễn dịch đồng nhất trong hơn 50% u. Kháng thể DH8.3 cho kết quả dương tính ở 15/46 (32.6%) u thần kinh đệm, 9 mẫu thể hiện hoạt tính miễn dịch đồng nhất. Kết quả nhuộm màu hóa miễn dịch các khối u không chọn lọc được sắp xếp trong Bảng 5.

Có sự phù hợp giữa mAb806 và DH8.3 trong mọi trường hợp ngoại trừ một trường hợp (số 35). Phân tích phân tử về sự có mặt của phiên bản khuếch đại của EGFR được tiến hành trong 44 trường hợp (Bảng 5). Trong số 44 trường hợp này, có 30 trường hợp có cùng mô hình về hoạt tính miễn dịch so với mô hình của mAb806 đã xác định được trước đó: ví dụ, 16 trường hợp âm tính mAb806 cho thấy không có sự khuếch đại EGFR và 14 trường hợp EGFR được khuếch đại cũng cho kết quả dương tính với mAb806. Tuy nhiên, 13 trường hợp, thể hiện hoạt tính miễn dịch với mAb806, đều không có sự khuếch đại EGFR (cho kết quả âm tính) trong khi đó một trường hợp EGFR-được khuếch đại cho kết quả âm tính với mAb806. Phân tích thêm về tình trạng đột biến của các trường hợp không có sự khuếch đại EGFR và dương tính với mAb806 được mô tả dưới đây và là cơ sở để giải thích cho hầu hết trong số 13 trường hợp không có sự khuếch đại EGFR và được nhận biết bởi kháng thể 806.

Tiếp theo, tiến hành phân tích đột biến loại bỏ bằng RT-PCR của 41/46 trường hợp (Bảng 5). Trong số này, 34 trường hợp cùng loại với DH8.3 đặc hiệu với đột biến loại bỏ: 12 trường hợp cho kết quả dương tính trong cả RT-PCR lẫn hóa mô miễn dịch và 22 trường hợp cho kết quả âm tính/âm tính. Ba trường hợp (số 2, số 34, và số 40) cho kết quả dương tính với DH8.3/âm tính trong RT-PCR về đột biến loại bỏ và 3 trường hợp (số 12, số 18, và số 39) cho kết quả âm tính với DH8.3/dương tính với RT-PCR. Như mong đợi dựa trên kết quả phân tích về tính đặc hiệu trước đó của các tác giả sáng chế, quan sát thấy hoạt tính miễn dịch của mAb806 ở tất cả các mô cho kết quả dương tính với DH8.3 ngoại trừ một trường hợp (số 35).

Trường hợp số 3 cũng cho thấy có sự đột biến (được ký hiệu là A2 trong Bảng 5), bao gồm các trình tự của thể đột biến de2-7, nhưng dường như không phải là đột

biến loại bỏ de2-7 cổ điển với việc mất 801 bazơ (số liệu không được thể hiện). Trường hợp này cho kết quả âm tính với hoạt tính DH8.3 nhưng thể hiện hoạt tính với mAb806, điều này cho thấy mAb806 có thể nhận biết đột biến EGFR bổ sung và có thể là EGFR đặc trưng.

Bảng 5

Phân tích hóa mô miễn dịch 46 u thần kinh đệm không chọn lọc bằng mAb 528, 806, và DH8.3

#	Kháng thể 528	Kháng thể 806	Kháng thể DH8.3	EGFR Amp.*	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (phát hiện)	âm tính	N	A2
4	++++	++++	âm tính	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	âm tính	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	A	5' MUT
9	++++	++++	âm tính	A	WT
10	++++	âm tính	âm tính	N	WT
11	++	++	++	A	5' MUT
12	++++	++	âm tính	A	5' MUT
13	++++	++++	âm tính	N	WT
14	++	âm tính	âm tính	Nd	nd
15	++	++	âm tính	N	WT
16	+	âm tính	âm tính	N	nd
17	++++	âm tính	âm tính	N	WT
18	++++	++++	âm tính	A	5' MUT
19	++++	++++	âm tính	N	WT
20	++++	âm tính	âm tính	N	WT
21	++++	++++	âm tính	N	WT
22	+++	âm tính	âm tính	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT

#	Kháng thể 528	Kháng thể 806	Kháng thể DH8.3	EGFR Amp.*	5' MUT
24	++++	++++	âm tính	A	WT
25	++++	âm tính	âm tính	N	WT
26	++++	++++	+++	A	5' MUT
27	âm tính	âm tính	âm tính	N	WT
28	+++	âm tính	âm tính	N	WT
29	âm tính	âm tính	âm tính	N	WT
30	++++	++++	âm tính	N	WT
31	++++ phát hiện một phần	âm tính	âm tính	N	nd
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	âm tính	++++	A	5' MUT
36	+++	++	+++	A	5' MUT
37	++++	+	+	A	5' MUT
38	++++	âm tính	âm tính	N	WT
39	++	âm tính	âm tính	N	5' MUT
40	++++	++++	+	A	WT
41	++	âm tính	âm tính	N	WT
42	++++	++++	âm tính	A	WT
43	++++	âm tính	âm tính	nd	nd
44	++++	âm tính	âm tính	N	WT
45	++++	âm tính	âm tính	N	WT
46	++++	âm tính	âm tính	N	nd

* N = không được khuếch đại, A- được khuếch đại,
+WT= kiểu dại, 5' MUT - đột biến ở đầu 5'
nd = không phát hiện được

Hoạt tính kháng thể 806 có cùng kiểu với EGFR được khuếch đại hoặc đột biến de2-7 EGFR trong 19/27 hoặc hơn 70% trường hợp. Đáng chú ý là 2 trong số 8 trường hợp này cũng phản ứng với kháng thể DH8.3.

Ví dụ 16. Điều trị toàn thân và phân tích u thần kinh đệm trong não

Để thử nghiệm hiệu quả của kháng thể đơn dòng kháng-ΔEGFR, mAb806, các tác giả sáng chế điều trị cho chuột nhắt trụi lông mang u thần kinh đệm ghép khác loại biểu hiện quá mức ΔEGFR bằng cách tiêm vào trong màng bụng kháng thể mAb806, đối chứng cùng lớp IgG hoặc PBS.

Do các mô cấy ban đầu của u thần kinh đệm ở người nhanh chóng bị mất biểu hiện thụ thể được khuếch đại và sắp xếp lại trong môi trường nên không có dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm bất kỳ có biểu hiện nêu trên. Để duy trì mức biểu hiện tương đương với mức biểu hiện quan sát được ở u người, các tế bào U87MG, LN-Z308 và A1207 (do Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY cung cấp) được gây nhiễm bằng virut ΔEGFR, ΔEGFR khuyết kinaza (DK), hoặc EGFR kiểu dại (wtEGFR), các virut này cũng kháng G418 như đã mô tả trước đây (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7727-7731).

Các quần thể tế bào biểu hiện các alen EGFR khác nhau với các mức tương tự (các mức biểu hiện này gần tương ứng với mức khuếch đại 25 bản sao gen; u thần kinh đệm ở người thường có mức khuếch đại thụ thể bị cắt từ 10 đến 50 bản sao gen) được chọn bởi FACS như đã mô tả trước đây (Nishikawa et al., 1994) và được ký hiệu là U87MG.ΔEGFR, U87MG.DK, U87MG.wtEGFR, LN-Z308.ΔEGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308.wtEGFR, A1207.ΔEGFR, A1207.DK và A1207.wtEGFR, tương ứng. Mỗi tế bào được giữ trong môi trường chứa G418 (các dòng tế bào U87MG, 400 μg/ml; các dòng tế bào LN-Z308 và A1207, 800 μg/ml).

Các tế bào U87MG.ΔEGFR (1×10^5) hoặc 5×10^5 LN-Z308.ΔEGFR, A1207.ΔEGFR, U87MG, U87MG.DK, và các tế bào U87MG.wtEGFR trong 5 μl PBS được cấy vào thể vân bên phải của não chuột nhắt trụi lông như đã mô tả trước đây (Mishima et al. (2000) A peptide derived from the non-receptor binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 8484-8489). Điều trị toàn thân bằng kháng thể mAb806, hoặc đối chứng cùng lớp IgG2b, được thực hiện bằng cách tiêm trong màng bụng 1 μg kháng thể với thể tích 100μl cách ngày sau khi

cấy ghép từ ngày 0 đến ngày thứ 14. Để điều trị trực tiếp các u U87MG.ΔEGFR trong não, 10 μg kháng thể mAb806, hoặc đối chứng cùng lớp IgG2b, với thể tích 5 μl được tiêm vào vị trí tiêm u cách ngày, bắt đầu vào ngày thứ 1 trong 5 ngày.

Chuột nhắt được xử lý bằng PBS hoặc đối chứng cùng lớp IgG có thời gian sống sót trung bình là 13 ngày, trong khi đó chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể 806 có thời gian sống sót trung bình tăng 61,5%, lên đến 21 ngày ($P < 0,001$; Fig.24A).

Điều trị chuột nhắt 3 ngày sau khi cấy ghép, sau khi tạo u, cũng kéo dài thời gian sống sót trung bình của chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể 806 46,1% (từ 13 ngày lên đến 19 ngày; $P < 0,01$) so với thời gian sống sót trung bình của chuột nhắt ở các nhóm đối chứng (số liệu không được thể hiện).

Để xác định xem liệu các tác dụng kháng u của kháng thể 806 (mAb806) có mở rộng đến các u ghép khác loài U87MG.ΔEGFR hay không, chế độ điều trị tương tự được dùng cho các con vật mang các u thần kinh đệm ghép khác loại LN-Z308.ΔEGFR và A1207.ΔEGFR. Thời gian sống sót trung bình của chuột nhắt được điều trị bằng mAb806 mang các u ghép khác loài LN-Z308.ΔEGFR được kéo dài từ 19 ngày đối với các nhóm đối chứng lên đến 58 ngày ($P < 0,001$; Fig.24B). Đáng chú ý là, bốn trong số tám con vật được điều trị bằng mAb806 có thời gian sống sót lên đến 60 ngày (Fig.24B). Thời gian sống sót trung bình của các con vật mang các u ghép khác loài A1207.ΔEGFR cũng được kéo dài từ 24 ngày lên đến 29 ngày đối với các con vật trong nhóm đối chứng ($P < 0,01$; số liệu không được thể hiện).

Điều trị bằng kháng thể mAb806 ức chế sự phát triển u não biểu hiện quá mức ΔEGFR

Chuột nhắt mang các u ghép khác loài U87MG.ΔEGFR và LN-Z308.ΔEGFR lần lượt bị giết vào ngày thứ 9 và thứ 15. Các lát cắt u được phân tích mô học và thể tích u được xác định. Phù hợp với kết quả quan sát được về thời gian sống sót của động vật, việc điều trị bằng kháng thể mAb806 làm giảm đáng kể thể tích u khoảng 90% đối với u ghép khác loài U87MG.ΔEGFR. ($P < 0,001$; Fig.24C) và hơn 95% ($P < 0,001$; Fig.24D) đối với u ghép khác loài LN-Z308.ΔEGFR so với các nhóm đối chứng. Kết quả tương tự cũng thu được đối với các con vật mang u A1207.ΔEGFR (làm giảm 65% thể tích, $P < 0,01$; số liệu không được thể hiện).

Điều trị trong u bằng mAb806 kéo dài thời gian sống sót của chuột nhắt mang u não U87MG.ΔEGFR

Hiệu lực điều trị u ghép khác loài U87MG.ΔEGFR của kháng thể mAb806 bằng cách tiêm trực tiếp vào trong u cũng được xác định. Các con vật được tiêm trong u kháng thể mAb806 hoặc đối chứng cùng lớp IgG một ngày sau khi cấy ghép. Các con vật đối chứng sống sót trong 15 ngày, trong khi đó chuột nhắt được điều trị bằng mAb806 sống sót trong 18 ngày ($P < 0,01$; Fig.24E). Trong khi điều trị trong u bằng mAb806 đem lại hiệu quả nhất định nhưng nó cũng gặp phải nhiều khó khăn khi phải tiêm trong não nhiều lần và tăng nguy cơ nhiễm khuẩn. Do đó, các tác giả sáng chế tập trung vào việc điều trị toàn thân ở các nghiên cứu tiếp theo.

Điều trị bằng mAb806 kéo dài không đáng kể thời gian sống sót của chuột nhắt mang u ghép khác loài U87MG.wtEGFR nhưng không mang u ghép khác loài trong não U87MG hoặc U87MG.DK

Để xác định khả năng mAb806 ức chế có chọn lọc đối với sự phát triển của các khối u biểu hiện ΔEGFR, các tác giả sáng chế xử lý con vật mang các u ghép khác loài trong não U87MG, U87MG.DK (ΔEGFR thiếu hụt kinaza) và U87MG.wtEGFR. Việc xử lý bằng mAb806 không kéo dài thời gian sống sót của những con chuột nhắt được cấy ghép u U87MG (Fig.25A) biểu hiện mức EGFR kiểu dại (wtEGFR) nội sinh thấp (Huang et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J. Biol. Chem., 272, 2927-2935), hoặc chuột nhắt mang u ghép khác loài U87MG.DK biểu hiện quá mức ΔEGFR thiếu hụt kinaza ngoài mức EGFR kiểu dại (wtEGFR) nội sinh thấp (Fig.25B). Việc xử lý bằng mAb806 kéo dài không đáng kể thời gian sống sót của chuột nhắt mang u U87MG.wtEGFR ($P < 0,05$, thời gian sống sót trung bình là 23 ngày so với 26 ngày đối với các nhóm đối chứng) biểu hiện quá mức wtEGFR (Fig.25C).

Hoạt tính của mAb806 có mối tương quan với hoạt lực kháng u *in vivo*

Để hiểu được hiệu quả khác nhau của mAb806 trên các khối u biểu hiện các mức và các loại EGFR khác nhau, các tác giả sáng chế đã xác định hoạt tính của mAb806 với các tế bào u khác nhau bằng phương pháp phân tích FACS. Các tế bào được nhuộm màu được phân tích bằng FACS Calibur bằng cách sử dụng phần mềm Cell

Quest (Becton-Dickinson PharMingen). Đối với kháng thể thứ nhất, các kháng thể sau đây được sử dụng: kháng thể 806, kháng thể kháng EGFR dòng 528, và dòng EGFR. 1. IgG2a hoặc IgG2b của chuột nhắt được sử dụng làm đối chứng cùng lớp.

Phù hợp với các báo cáo trước đây (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7727-7731), kháng thể 528 kháng EGFR nhận biết cả ΔEGFR lẫn wtEGFR và thể hiện sự nhuộm màu với cường độ mạnh hơn đối với các tế bào U87MG.ΔEGFR so với các tế bào U87MG (Fig.26A, 528).

Ngược lại, kháng thể EGFR.1 phản ứng với wtEGFR, nhưng không phản ứng với ΔEGFR (Nishikawara et al., 1994), do các tế bào U87MG.ΔEGFR phản ứng yếu với các tế bào U87MG (Fig.26A, bảng EGFR.1).

Kháng thể EGFR.1 phản ứng với U87MG.wtEGFR mạnh hơn so với các tế bào U87MG, do các tế bào U87MG.wtEGFR biểu hiện quá mức wtEGFR (Fig.26A, bảng EGFR.1). Mặc dù mAb806 phản ứng mạnh với các tế bào U87MG.ΔEGFR và U87MG.DK và không phản ứng với các tế bào U87MG cũng như phản ứng yếu với các tế bào U87MG.wtEGFR, điều này cho thấy kháng thể mAb806 có tính chọn lọc đối với ΔEGFR với hoạt tính chéo yếu để biểu hiện quá mức wtEGFR (Fig.26A, bảng mAb806).

Mức phản ứng với U87MG.wtEGFR được định lượng và định tính tương tự với phương pháp định lượng và định tính thời gian sống sót được kéo dài khi điều trị bằng kháng thể này (Fig.25C).

Các tác giả sáng chế cũng xác định thêm tính đặc hiệu của kháng thể mAb806 bằng phương pháp kết tủa miễn dịch. Các EGFR ở dòng tế bào khác nhau được kết tủa miễn dịch bằng các kháng thể mAb806, kháng thể kháng EGFR, dòng 528 (Oncogene Research Products, Boston, MA), hoặc dòng EGFR.1 (Oncogene Research Products).

Tóm tắt như sau, các tế bào được làm tan bằng đệm dung giải chứa HEPES 50mM (độ pH = 7,5), NaCl 150mM, glyxerol 10%, Triton X-100 1%, EDTA 2mM, SDS 0,1%, natri deoxycholat 0,5%, natri Ppi 10 mM, phenylmetylsulfonyl florua 1mM, Na_3VO_4 2mM, leupeptin 5μg/ml và aprotinin 5μg/ml. Các kháng thể được ủ với dịch tan tế bào ở 4°C trong 1 giờ trước khi bổ sung protein-A và -G Sepharose. Các

kết tủa miễn dịch được rửa hai lần bằng đệm dung giải và một lần bằng đệm HNTG (HEPES 50mM (độ pH=7,5), NaCl 150mM, Triton X-100 0,1%, và glyxerol 10%), được điện di, và chuyển lên các màng nitroxenluloza. Các vết của protein được tách bằng phương pháp điện di được dò bằng kháng thể kháng EGFR, C13 (được Dr. G. N. Gill, University of California, San Diego, CA cung cấp), được sử dụng để phát hiện cả EGFR kiểu dại và ΔEGFR trên các vết thẩm tách miễn dịch (Huang et al., 1997), và các protein được quan sát bằng cách sử dụng hệ thống phát hiện quang hóa ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Các kháng thể kháng Bcl-X (kháng thể đa dòng của thỏ; Transduction Laboratories, Lexington, KY) và phosphoTyrosin (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) được sử dụng trong phương pháp phân tích thẩm tách Western như đã mô tả trước đây (Nagane et al. (1998) Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 5724-5729).

Phù hợp với kết quả của phép phân tích FACS, kháng thể 528 nhận biết wtEGFR và các thụ thể đột biến (Fig.26B - bảng IP: 528), trong khi đó kháng thể EGFR.1 phản ứng với wtEGFR, nhưng không phản ứng với các dạng đột biến (Fig.26B, bảng IP:EGFR.1). Ngoài ra, các mức của thụ thể đột biến trong các tế bào U87MG.ΔEGFR và U87MG.DK tương đương với các mức của wtEGFR trong các tế bào U87MG.wtEGFR (Fig.26B, bảng IP: 528).

Tuy nhiên, kháng thể mAb806 có khả năng chỉ kết tủa một lượng nhỏ wtEGFR trong dịch tan tế bào U87MG.wtEGFR so với các lượng lớn hơn của thụ thể đột biến được kết tủa từ các tế bào U87MG.ΔEGFR và U87MG.DK, và lượng không thể phát hiện được từ các tế bào U87MG (Fig.26B, bảng IP:mAb806). Tóm lại, những số liệu này cho thấy rằng mAb806 nhận biết epitop trong ΔEGFR mà có với lượng nhỏ wtEGFR chỉ khi nó biểu hiện quá mức trên bề mặt tế bào (xem phần thảo luận cụ thể và các tài liệu tham khảo về epiotp của mAb806 bên dưới).

Điều trị bằng mAb806 làm giảm sự tự phosphoryl hóa ΔEGFR và điều hòa giảm mức biểu hiện Bcl.X_L trong u não U87MG.ΔEGFR

Các cơ chế mAb806 ức chế sự sinh trưởng được nghiên cứu sau. Do hoạt tính của kinaza có hoạt tính cơ định và quá trình tự phosphoryl hóa đầu carboxyl của

ΔEGFR cần thiết cho các chức năng sinh học của nó (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-7731; Huang et al., 1997; Nagane et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. Cancer Res., 56, 5079-5086; Nagane et al. (2001) Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. Cancer Lett. 162 (Suppl.1), S17-S21)) nên trạng thái phosporyl hóa của ΔEGFR được xác định trong các khối u lấy từ con vật được điều trị và con vật đối chứng. Như được nêu trong Fig.27A, việc điều trị bằng mAb806 làm giảm mạnh mức tự phosphoryl hóa của ΔEGFR, mặc dù các mức thụ thể chỉ giảm không đáng kể ở u ghép khác loài được điều trị bằng mAb806. Các tác giả sáng chế trước đó đã chỉ ra rằng quá trình tự phosphoryl hóa thụ thể gây ra sự điều hòa tăng của gen kháng lại quá trình chết theo chương trình của tế bào, Bcl-X_L, gen này đóng vai trò quan trọng trong việc làm giảm quá trình chết theo chương trình của tế bào u biểu hiện quá mức ΔEGFR (Nagane et al., 1996; Nagane et al., 2001). Do đó, hiệu quả của việc xử lý bằng mAb806 đối với sự biểu hiện Bcl-X_L được xác định sau. Thực vậy, các u ΔEGFR thu được từ các động vật được xử lý bằng mAb806 thể hiện mức Bcl-X_L được giảm (Fig.27A).

Điều trị bằng mAb806 làm giảm sự phát triển và tạo mạch bằng cách phân nhánh, và làm tăng quá trình chết theo chương trình của tế bào U87MG.ΔEGFR

Dựa vào sự ức chế *in vivo* do việc điều trị bằng mAb806 gây ra và ảnh hưởng sinh hóa của kháng thể này đến quá trình truyền tín hiệu thụ thể, các tác giả sáng chế xác định tốc độ tăng sinh của u ở nhóm chuột nhắt đối chứng hoặc nhóm chuột nhắt được điều trị. Chỉ số tăng sinh, được xác định bằng nhuộm màu Ki-67 đối với u được xử lý bằng mAb806, thấp hơn đáng kể so với chỉ số tăng sinh của u đối chứng ($P < 0,001$; Fig.28).

Tóm tắt như sau, để đánh giá sự tạo mạch bằng cách phân nhánh trong các khối u, các u này được cố định trong dung dịch chứa kẽm clorua, nhúng vào trong parafin, cắt lát mỏng, và nhuộm màu miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng chuột cống kháng chuột nhắt CD31 (Becton-Dickinson PharMingen; 1:200). Việc đánh giá sự tăng sinh

của tế bào u được tiến hành bằng hóa mô miễn dịch Ki-67 trên các mô u nhúng trong parafin được cố định trong formalin. Sau khi loại bỏ parafin và hòa tan trong nước, ủ các lát cắt u này với hydro peroxit 3% trong metanol để loại bỏ peroxidaza nội sinh. Các lát cắt này được phong bế trong 30 phút bằng huyết thanh dê và ủ qua đêm với kháng thể thứ nhất ở 4°C. Các lát cắt này sau đó được rửa bằng PBS và ủ với kháng thể thứ hai được biotin hóa trong 30 phút. Sau khi rửa vài lần bằng PBS, các sản phẩm được quan sát bằng cách sử dụng streptavidin-peroxidaza của cây cải ngựa với diaminobenzidi làm chất tạo màu và hematoxylin làm chất nhuộm đối màu. Dưới dạng tiêu chuẩn để đánh giá sự tăng sinh, chỉ số đánh dấu Ki-67 được xác định là tỷ lệ của nhân tế bào được đánh dấu:tổng nhân tế bào trong trường công suất lớn (3400).

Khoảng 2000 nhân tế bào được đếm trong mỗi trường hợp bằng phương pháp lấy mẫu tự nhiên. Khi nhuộm màu đại thực bào và tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), các lát cắt được đông lạnh, cố định bằng dung dịch được đệm 4% paraformaldehyt, được nhuộm màu miễn dịch sử dụng mAbF4/80 được biotin hóa (Serotec, Raleigh, NC) và kháng thể đa dòng thỏ kháng asialo GM1 (Dako Chemicals, Richmond, VA), tương ứng. Sự tạo mạch bằng cách phân nhánh được định lượng dưới dạng diện tích mạch bằng các phân tích trên máy tính. Nhằm mục đích này, các lát cắt được nhuộm màu miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể kháng-CD31 và được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống phân tích ảnh trên máy tính mà không cần nhuộm đối màu. Diện tích vi mạch (microvascular area - MVA) được xác định bằng cách chụp ảnh bằng máy ảnh số các lát cắt với độ phóng đại 3200 sử dụng máy ảnh màu CCD như đã mô tả trước đây (Mishima et al., 2000). Sau đó, phân tích các ảnh thu được sử dụng phần mềm Image Pro Plus phiên bản 4,0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) và MVA được xác định bằng cách xác định tổng lượng màu nhuộm trong mỗi lát cắt. Bốn trường được đánh giá cho mỗi vật kính. Giá trị này được thể hiện % tổng diện tích trong mỗi trường. Các kháng thể được khẳng định trong mỗi thử nghiệm bởi ít nhất hai người quan sát (K. M., H-J. S. H.).

Ngoài ra, các tế bào chết theo chương trình được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp TUNEL như đã mô tả trước đây (Mishima et al., 2000). Các tế bào cho kết quả dương tính trong phương pháp TUNEL được đếm ở X400. Chỉ số tế bào chết theo chương trình được tính toán là tỷ lệ của số tế bào chết theo chương trình : tổng số tế bào trong mỗi trường. Phân tích chỉ số tế bào chết theo chương trình thông qua

phương pháp nhuộm màu TUNEL cho thấy số tế bào chết theo chương trình tăng lên đáng kể ở các u được xử lý bằng mAb806 so với các khối u đối chứng ($P < 0,001$; Fig.28).

Mức độ tạo mạch mới của u cũng được phân tích bằng cách nhuộm màu miễn dịch các khối u lấy từ mẫu được xử lý và mẫu đối chứng đối với CD31. Để định lượng sự tạo mạch mới của u, MVA được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích ảnh trên máy tính. Các u được xử lý bằng mAb806có MVA nhỏ hơn 30% so với các khối u đối chứng ($P < 0,001$; Fig.28).

Để xác định xem liệu tương tác giữa thụ thể và kháng thể có thể loại bỏ đáp ứng viêm hay không, các tác giả sáng chế tiến hành nhuộm màu các lát cắt u theo gen đánh dấu của đại thực bào, F4/80, và gen đánh dấu tế bào NK, asialo GM1. Các đại thực bào được xác định trong toàn bộ chất nền u và nhất là chất nền được tích tụ xung quanh vùng ngoại biên của u U87MG.ΔEGFR được xử lý bằng mAb806 (Fig.28). Các tác giả sáng chế đã quan sát một vào tế bào NK được thấm lọc vào trong và xung quanh u và không phát hiện thấy sự khác nhau đáng kể giữa u được xử lý bằng mAb806 và u đối chứng isotyp (số liệu không được thể hiện).

Ví dụ 17. Liệu pháp miễn dịch kết hợp giữa mAb806 và mAb528

Các thử nghiệm được nêu ở đây mô tả công trình nghiên cứu *in vivo* được thiết kế để xác định hiệu lực của các kháng thể theo sáng chế.

Chuột nhắt cái trụi lông, 4-6 tuần tuổi, được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Chúng được nhận 3×10^6 tế bào u bằng cách chủng dưới da ở các bên sườn.

Chúng được nhận tế bào U87MG.D2-7, tế bào U87MG.DK, hoặc tế bào A431, tất cả các tế bào này đã được mô tả ở trên. Liệu pháp bắt đầu khi các khối u phát triển đến kích thước đủ lớn.

Sau đó, chúng được tiêm một trong số các thành phần sau: (i) nước muối đệm phosphat, (ii) mAb806 (0,5 mg/1 lần tiêm), (iii) mAb528 (0,5mg/1 lần tiêm), hoặc (iv) hỗn hợp gồm hai kháng thể nêu trên. Liên quan đến thành phần "(iv)" các nhóm chuột khác nhau được nhận 0,5 mg/1 lần tiêm đối với từng kháng thể, hoặc 0,25 mg/1 lần tiêm đối với từng kháng thể.

Nhóm chuột đầu tiên được thử nghiệm là nhóm chuột được nhận tế bào U87MG.D2-7 bằng cách tiêm. Liệu trình điều trị bắt đầu từ ngày thứ 9 sau khi chủng, và tiếp tục 3 lần trong 2 tuần (nghĩa là, những con chuột này được tiêm một trong số các thành phần nêu trên vào ngày thứ 9, 11, 13, 16, 18 và 20 ngày sau khi chúng được chủng các tế bào). Vào ngày bắt đầu của liệu trình điều trị, kích thước trung bình của u là 115 mm^3. Mỗi nhóm gồm 50 con, mỗi con được chủng hai loại u.

Trong nhóm chuột được nhận hỗn hợp các kháng thể (0,5 mg/1 lần tiêm đối với mỗi kháng thể), có ba con mất hoàn toàn khối u. Những con chuột ở các nhóm bất kỳ khác không có kết quả này. Fig.18A thể hiện kết quả này trên đồ thị.

Trong nhóm chuột thứ hai, các tế bào dùng chủng tương tự như các tế bào dùng để chủng cho nhóm chuột thứ nhất, ngoại trừ liệu pháp kết hợp bao gồm 0,25 mg mỗi kháng thể một lần tiêm. Chúng được tiêm vào ngày thứ 10, 12, 14, 17, 19 và 21 sau khi chủng bằng các tế bào. Vào ngày bắt đầu của liệu trình điều trị, kích thước trung bình của u đạt 114 mm^3. Kết quả được nêu trong Fig.18B.

Nhóm chuột thứ ba được chủng bằng các tế bào U87MG.DK. Việc tiêm kháng thể điều trị bắt đầu vào ngày thứ 18 sau khi chủng các tế bào nêu trên, và tiếp tục vào ngày thứ 20, 22, 25, 27 và 29. Kích thước trung bình của u vào ngày bắt đầu của liệu trình điều trị là 107 mm^3. Fig.18C tóm tắt các kết quả. Thành phần tiêm để điều trị là tương tự như thành phần tiêm để điều trị cho nhóm thứ nhất.

Cuối cùng, nhóm chuột thứ tư, nhóm này được chủng tế bào A431, nhận các thành phần tiêm như đối với chuột nhóm I và III, vào ngày thứ 8, 10, 12 và 14 ngày sau khi chủng. Vào ngày bắt đầu của liệu trình điều trị, kích thước trung bình của u was 71 mm^3. Kết quả được nêu trong Fig.18D.

Kết quả cho thấy liệu pháp điều trị kết hợp kháng thể cho tác dụng hiệp đồng trong việc làm giảm kích thước khối u. Xem Fig.18A. Hiệu quả tương tự cũng được quan sát thấy ở liều dùng thấp hơn như trên Fig.18B, điều này cho thấy hiệu quả không chỉ phụ thuộc vào mức liều dùng.

Liệu pháp kết hợp không ức chế sự phát triển U87MG.DK (Fig.18C), điều này cho thấy chức năng miễn dịch của kháng thể không phải không phải là nguyên nhân làm giảm u được quan sát thấy trên Fig.18A và 18B.

Cần chú ý rằng như được nêu trong Fig.18D, liệu pháp kết hợp cũng có tác dụng hiệp động trên các khối u A431, với 4 liều dùng sẽ cho tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn là 60%. Số liệu này cho thấy rằng phân tử EGFR được nhận biết bởi mAb806 có chức năng khác với chức năng bị ức chế bởi kháng thể 528.

Ví dụ 18. Kháng thể mAb806 ức chế sự phát triển của u ghép khác loài

Như được đề cập theo sáng chế, và chứng minh thêm và được đề cập cụ thể trong ví dụ này, bất ngờ rằng kháng thể mAb806 được phát hiện thấy có tác dụng ức chế sự phát triển của u ghép khác loài biểu hiện de2-7 EGFR hoặc EGFR được khuếch đại, nhưng không biểu hiện EGFR kiểu dại.

Các dòng tế bào và các kháng thể được chuẩn bị như được mô tả trong Ví dụ 1. Để xác định tính đặc hiệu của mAb806, mà nó liên kết với các tế bào U87MG, U87MG.D2-7 và U87MG.wtEGFR được phân tích bằng FACS. Tóm tắt như sau, các dòng tế bào U87MG bố mẹ sau khi nuôi cấy và chuyển nhiễm, được phân tích mức biểu hiện EGFR kiểu dại và de2-7 EGFR sử dụng các kháng thể 528, 806, và DH8.3. Các tế bào (1 3 10 6) được ủ với 5 µg/ml kháng thể thích hợp hoặc đối chứng âm ghép cặp isotyp trong PBS chứa 1% HSA trong 30 phút ở 4°C. Sau khi rửa ba lần bằng PBS/1% HSA, các tế bào được ủ trong 30 phút nữa ở 4°C với kháng thể dê kháng chuột nhắt kết hợp với FTTC (tỷ lệ pha loãng 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Sau khi rửa ba lần liên tiếp, các tế bào được phân tích trên Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL) bằng cách quan sát tối thiểu 20.000 lần và phân tích bằng cách sử dụng EXPO (phiên bản 2) cho Windows. Kháng thể không liên quan IgG2b (mAb100-310 nhận biết kháng nguyên A33 ở người) được sử dụng làm đối chứng cùng lớp cho mAb806, và kháng thể 528 được sử dụng do nó nhận biết cả de2-7 và wtEGFR.

Chỉ có kháng thể 528 có khả năng nhuộm màu dòng tế bào U87MG (Fig.29), điều này phù hợp với các báo cáo trước đây và cũng cho thấy rằng các tế bào này biểu hiện wtEGFR (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-7731). Các mức liên kết của mAb806 tương tự như các mức liên kết của kháng thể đối chứng, điều này cho thấy rõ ràng là mAb806 không có khả năng liên kết với wtEGFR (Fig.29). Mức liên kết của kháng thể đối chứng cùng lớp với dòng tế

bào U87MG.D2-7 và dòng tế bào U87MG.wtEGFR tương tự với mức được quan sát thấy đối với các tế bào U87MG. mAb806 nhuộm màu các tế bào U87MG.D2-7 và các tế bào U87MG.wtEGFR, điều này cho thấy mAb806 nhận biết đặc hiệu d2-7 EGFR và các dạng hoặc các tiểu phần của EGFR được biểu hiện quá mức (Fig.29). Như mong đợi, kháng thể 528 nhuộm màu cả dòng tế bào U87MG.D2-7 lẫn dòng tế bào U87MG.wtEGFR (Fig.29). Cường độ nhuộm màu của kháng thể 528 trên các tế bào U87MG.wtEGFR lớn hơn nhiều so với mAb806, điều này cho thấy rằng mAb806 chỉ nhận biết một phần EGFR được biểu hiện quá mức. Hoạt tính của mAb806 với các tế bào U87MG.wtEGFR quan sát được tương tự như hoạt tính thu được với các tế bào A431, dòng tế bào khác biểu hiện quá mức wtEGFR.3.

Phân tích Scatchard được tiến hành bằng cách sử dụng các tế bào U87MG.D2-7 và các tế bào A431 để xác định ái lực tương đối và các vị trí liên kết của mAb806 trên mỗi dòng tế bào. mAb806 có ái lực đối với thụ thể de2-7EGFR bằng $1,1\times10^{9}$ M^{-1} và nhận biết trung bình (3 thử nghiệm riêng biệt) $2,4\times10^{5}$ vị trí liên kết/tế bào, như nêu trong Ví dụ 4. Ngược lại, ái lực của mAb806 đối với wtEGFR trên các tế bào A431 chỉ bằng $9,5\times10^{7}$ M^{-1}, như nêu trong Ví dụ 8. Điều đáng quan tâm là, mAb806 nhận biết $2,3\times10^{5}$ vị trí liên kết trên bề mặt của các tế bào A431, giá trị này thấp hơn khoảng 10 lần so với số lượng EGFR được báo cáo và phát hiện thấy trong các tế bào này. Để khẳng định số lượng EGFR trên bề mặt các tế bào A431, các tác giả sáng chế tiến hành phép phân tích Scatchard bằng cách sử dụng kháng thể 528 được đánh dấu bằng ^{125}I. Như mong đợi, kháng thể này liên kết với khoảng 2×10^{6} vị trí liên kết trên bề mặt của các tế bào A431. Do đó, dường như mAb806 chỉ liên kết với một phần của thụ thể EGFR trên bề mặt của các tế bào A431. Quan trọng là, mAb806 được đánh dấu bằng ^{125}I hoàn toàn không liên kết đặc hiệu với các tế bào U87MG bố mẹ, ngay cả khi số lượng tế bào tăng lên đến 1×10^{7}.

Hoạt tính của mAb806 được phân tích thêm trên nhiều dòng tế bào khác nhau bằng phương pháp kết tủa miễn dịch sau khi đánh dấu bằng ^{35}S, sử dụng mAb806, sc-03 (kháng thể đa dòng thương mại, đặc hiệu với vùng đầu COOH của EGFR) và đối chứng cùng lớp IgG2b. Tóm tắt như sau, các tế bào được đánh dấu trong 16 giờ bằng chất đánh dấu Tran ^{35}S có hoạt tính riêng 100 mCi/ml (ICN Biomedicals, Irvine, CA) trong môi trường DMEM không chứa methionin/xystein được bổ sung 5% FCS đã

thẩm tách. Sau khi rửa bằng PBS, các tế bào được đặt trong đệm dung giải (Triton X-100 1%, HEPES 30mM, NaCl 150mM, 4-(2-aminoetyl) benzensulfonylflorua (AEBSF) 500μM, aprotinin 150nM, chất ức chế proteaza E-64 nồng độ 1μM, EDTA 0,5mM, và leupeptin 1μM, độ pH=7,4) trong 1 giờ ở 4°C. Các dịch tan tế bào được làm trong bằng cách ly tâm trong 10 phút ở 12.000g và sau đó, được ủ với 5 μg kháng thể thích hợp trong 30 phút ở 4°C trước khi bổ sung Protein A-Sepharose. Các kết tủa miễn dịch được rửa ba lần bằng đệm dung giải, trộn với đệm mẫu SDS, tách bằng điện di trên gel sử dụng gel 4-20% Tris/Glyxin mà sau đó được làm khô, và cho tiếp xúc với màng tia X.

Kháng thể sc-03 kết tủa miễn dịch ba băng từ các tế bào U87MG.Δ2-7; băng kép tương ứng với các băng 2 de2-7 EGFR được quan sát thấy trong các tế bào này và băng có phân tử lượng lớn hơn tương ứng với wtEGFR (Fig.22 và 30). Ngược lại, trong khi mAb806 kết tủa miễn dịch hai băng de2-7 EGFR thì wtEGFR hoàn toàn không có mặt. Mô hình quan sát được trong các tế bào U87MG.wtEGFR và các tế bào A431 là tương đương. Một băng kháng thể sc-03 kết tủa miễn dịch tương ứng với wtEGFR từ các tế bào A431 (Fig.22 và 30). mAb806 cũng kết tủa miễn dịch với một băng tương ứng với wtEGFR đối với cả tế bào U87MG.wtEGFR lẫn tế bào A431 (Fig.22 và 30). Phù hợp với số liệu phân tích FACS và Scatchard, lượng EGFR được kết tủa miễn dịch bằng mAb806 cơ bản nhỏ hơn so với tổng lượng EGFR có mặt trên bề mặt tế bào. Do mAb806 và kháng thể sc-03 kết tủa miễn dịch d2-7 EGFR với các lượng tương đương nên kết quả này càng củng cố cho kết luận rằng mAb806 chỉ nhận biết một phần EGFR trong các tế bào biểu hiện quá mức thụ thể này. Kết quả so sánh giữa mAb806 và kháng thể 528 thể hiện mô hình của hoạt tính giống nhau (số liệu không được thể hiện). Kháng thể không liên quan IgG2b (kháng thể đối chứng cùng lớp cho mAb806) không kết tủa miễn dịch EGFR từ hai dòng tế bào này (Fig.22 và 30). Trong các điều kiện tương đương, mAb806 không kết tủa miễn dịch EGFR từ các tế bào U87MG bố mẹ (số liệu không được thể hiện).

mAb806 cũng được xác định hoạt lực đối với u U87MG và u U87MG.Δ2-7 trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài. Kháng thể hoặc tá dược được dùng trong màng bụng một ngày trước khi chủng u và được dùng ba lần một tuần trong hai tuần. Ở liều lượng 1 mg mAb806/1 lần tiêm, mAb806 không ảnh hưởng đến sự phát triển của các u

ghép khác loài U87MG bố mẹ biểu hiện wtEGFR (Fig.9A). Ngược lại, mAb806 lại ức chế đáng kể sự phát triển của các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 theo cách phụ thuộc liều dùng (Fig.9B). Hai mươi ngày sau khi chủng u, khi các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u là 1600 ± 180 mm^3 đối với nhóm đối chứng, nhỏ hơn đáng kể 500 ± 95 mm^3 đối với nhóm được nhận 0,1 mg mAb806/1 lần tiêm ($P < 0,0001$) và 200 ± 42 mm^3 đối với nhóm được nhận 1 mg mAb806/1 lần tiêm ($P < 0,0001$). Các con vật ở nhóm điều trị bị giết vào ngày thứ 24, vào thời điểm này thể tích trung bình của u là 1300 ± 240 mm^3 đối với nhóm được nhận 0,1 mg mAb806 và 500 ± 100 mm^3 đối với nhóm đối với nhóm được nhận 1 mg mAb806 ($P < 0,005$).

Dựa vào hoạt lực của mAb806 trong trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài, khả năng ức chế sự phát triển các u ghép khác loài đã được ghép của nó được xác định. Việc điều trị bằng kháng thể là như được mô tả trong mẫu phòng ngừa, ngoại trừ khi bắt đầu điều trị thể tích trung bình của u đạt 65 mm^3 (10 ngày sau khi cấy u) đối với các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và 84 mm^3 (19 ngày sau khi sau khi cấy u) đối với các u ghép khác loài U87MG bố mẹ (xem Ví dụ 10). Một lần nữa mAb806 lại không ảnh hưởng đến sự phát triển của các u ghép khác loài U87MG bố mẹ, ngay cả ở liều lượng 1 mg/1 lần tiêm (Fig.10A). Ngược lại, mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển của của các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 theo cách phụ thuộc liều dùng (Fig.10B). Vào ngày thứ 17, một ngày trước khi các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u là 900 ± 200 mm^3 đối với nhóm đối chứng, 400 ± 60 mm^3 đối với nhóm được nhận 0,1 mg /1 lần tiêm ($P < 0,01$), và 220 ± 60 mm^3 đối với nhóm được nhận 1 mg/1 lần tiêm ($P < 0,002$). Việc điều trị các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 bằng kháng thể đối chứng cùng lớp, IgG2b, không ảnh hưởng đến sự phát triển của u (số liệu không được thể hiện).

Để xác định xem liệu tác dụng ức chế sự phát triển quan sát được đối với mAb806 có bị giới hạn ở các tế bào biểu hiện de2-7 EGFR hay không, hoạt lực của kháng thể này đối với các u ghép khác loài U87MG.wtEGFR cũng được xác định trong mẫu điều trị u đã được ghép. Các tế bào này đóng vai trò làm mẫu cho các khối u có sự khuếch đại gen EGFR mà không biểu hiện de2-7 EGFR. Việc điều trị bằng mAb806 bắt đầu khi các khối u đạt thể tích trung bình là 73 mm^3 (22 ngày sau khi cấy u). mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển của các u ghép khác loài U87MG.wtEGFR đã được ghép so với các khối u đối chứng được xử lý bằng tá dược (Fig.10C). Vào

ngày các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u đạt 1000 ± 300 mm^3 đối với nhóm đối chứng và 500 ± 80 mm^3 đối với nhóm được nhận 1 mg/1 lần tiêm ($P < 0,04$).

Để đánh giá sự khác nhau về mô học có thể có giữa u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và u ghép khác loài U87MG.wtEGFR được điều trị bằng kháng thể mAb806 và đối chứng, các lát cắt u sau khi được cố định trong formalin, nhúng vào trong parafin sẽ được nhuộm màu bằng H&E (Fig.31). Các vùng bị hoại tử có thể phát hiện được đối với cả u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 (các u ghép khác loài được điều trị bằng mAb806 được thu nhận vào thời điểm 24 ngày sau khi chủng u và 18 ngày đối với các u ghép khác loài được xử lý bằng tá dược), và các u ghép khác loài U87MG.wtEGFR (các u ghép khác loài được điều trị bằng mAb806 thu nhận vào ngày thứ 42 sau khi chủng u và 37 ngày đối với các u ghép khác loài được xử lý bằng tá dược; Fig.31). Kết quả này phù hợp với kết quả quan sát được trong một số u ghép khác loài (n = 4 đối với mỗi dòng tế bào). Tuy nhiên, các lát cắt từ các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR được xử lý bằng tá dược (n = 5) không thể hiện các vùng bị hoại tử như các vùng bị hoại tử sau khi điều trị bằng mAb806 (Fig.31). Các u ghép khác loài được xử lý bằng tá dược và mAb806 được lấy ở cùng thời điểm cũng thể hiện sự khác nhau trong các vùng hoại tử u (số liệu không được thể hiện). Do đó, mức độ hoại tử gia tăng quan sát được không phải do thời gian phát triển lâu hơn được áp dụng cho các u ghép khác loài được điều trị bằng mAb806. Ngoài ra, các lát cắt từ các u ghép khác loài U87MG được điều trị bằng mAb806 cũng nhuộm màu H&E và cho thấy không có vùng hoại tử bất kỳ (số liệu không được thể hiện), điều này càng minh chứng cho giả thiết liên kết của mAb806 làm giảm khả năng sống sót của tế bào, làm tăng mức độ hoại tử trong các u ghép khác loài.

Phân tích hóa mô miễn dịch ghép khác loại các lát cắt từ u ghép khác loài U87MG, U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR được tiến hành để xác định mức biểu hiện de2-7 EGFR và wtEGFR sau khi điều trị bằng mAb806 (Fig.32). Như mong đợi, kháng thể 528 nhuộm màu tất cả các lát cắt từ các u ghép khác loài mà không thấy cường độ màu bị giảm rõ rệt giữa nhóm u được điều trị và u đối chứng (Fig.32). kết quả cho thấy không phát hiện thấy có sự nhuộm màu các lát cắt từ u ghép khác loài U87MG bằng mAb806; tuy nhiên, quan sát thấy các lát cắt của u ghép khác loài

U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR được nhuộm màu (cho kết quả dương tính) (Fig.32). Không có sự khác biệt giữa cường độ màu nhuộm giữa các u ghép khác loài U87MG.Δ2-7 và U87MG.wtEGFR đối chứng và được điều trị bằng mAb806, điều này cho thấy rằng việc điều trị bằng kháng thể này không dẫn đến sự chọn lọc các biến thể dòng không có hoạt tính với mAb806.

Để chứng minh rằng tác dụng kháng u của kháng thể mAb806 không chỉ giới hạn ở các tế bào U87MG, kháng thể này được sử dụng cho chuột nhắt có u ghép khác loài A431. Các tế bào này có gen EGFR được khuếch đại và biểu hiện khoảng 2×10^6 thụ thể/tế bào. Như được mô tả ở trên, kháng thể mAb806 liên kết với khoảng 10% EGFR nêu trên và có đích là u ghép khác loài A431. Kháng thể mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển của u ghép khác loài A431 khi được xét nghiệm trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài được mô tả trên đây (Fig.11A). Vào ngày thứ 13, khi các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u đạt 1385 ± 147,54 mm^3 ở nhóm đối chứng và 260 ± 60,33 mm^3 đối với nhóm điều trị được tiêm 1mg/1 lần tiêm ($p < 0,0001$).

Để chứng minh rằng tác dụng kháng u của kháng thể mAb806 không chỉ giới hạn ở các tế bào U87MG, kháng thể này được sử dụng cho chuột nhắt có u ghép khác loài A431. Các tế bào này có gen EGFR được khuếch đại và biểu hiện khoảng 2×10^6 thụ thể/tế bào. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng mAb806 liên kết với khoảng 10% EGFR và nhắm vào các u ghép khác loài A431 (Garcia et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell along carcinomas. Cancer Res. 53, 3217-3220). mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển các u ghép khác loài A431 khi được xác định trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài đã mô tả ở trên (Fig.11A). Vào ngày thứ 13, khi các con vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u đạt 1400 ± 150 mm^3 trong nhóm được xử lý bằng tá dược và đạt 260 ± 60 mm^3 đối với nhóm điều trị được dùng 1mg/1 lần tiêm ($P < 0,001$). Trong một thử nghiệm độc lập, liều dùng 0,1 mg kháng thể này cũng ức chế đáng kể ($P < 0,05$) sự phát triển của các u ghép khác loài A431 trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài (số liệu không được thể hiện) (xem Ví dụ 10).

Dựa trên hoạt lực của mAb806 trong mẫu phòng ngừa u ghép khác loài A431, khả năng ức chế sự phát triển các u ghép khác loài đã được ghép của nó được xác định. Việc điều trị bằng kháng thể như được mô tả trong mẫu phòng ngừa, ngoại trừ nó

không bắt đầu cho đến khi thể tích trung bình của u đạt 200 ± 20 mm^3. mAb806 ức chế đáng kể sự phát triển của các u ghép khác loài A431 đã được ghép (Fig.11B). Vào ngày thứ 13, ngày các động vật đối chứng bị giết, thể tích trung bình của u đạt 1100 ± 100 mm^3 đối với nhóm đối chứng và đạt 450 ± 70 mm^3 đối với nhóm điều trị được dùng 1mg/1 lần tiêm ($P < 0,0001$).

Ví dụ 19. Cấu trúc, biểu hiện và phân tích kháng thể 806 dạng khảm

Các kháng thể khảm là nhóm các phân tử, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, ví dụ của chuột nhắt, chuột cống hoặc các loài khác được tiếp hợp với các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người, các kháng thể khảm được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Một ưu điểm của các kháng thể khảm là chúng có thể làm giảm tác dụng kháng nguyên khác loài, tính miễn dịch vốn có của các kháng thể không phải của người (ví dụ, của chuột nhắt, chuột cống hoặc các loài khác). Ngoài ra, các kháng thể khảm được tạo ra bằng cách tái tổ hợp thường có thể được tạo ra với số lượng lớn, cụ thể là khi sử dụng các vectơ biểu hiện mức cao.

Để tạo ra các kháng thể khảm với số lượng lớn và mức biểu hiện cao, hệ thống biểu hiện động vật có vú được sử dụng rộng rãi, tốt nhất là hệ thống được sử dụng quy trình khuếch đại gen trong các tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO) thiếu hụt enzym dehydrofolat reductaza ("dhfr-"). Hệ thống này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hệ thống này dựa trên gen dhfr, mã hóa enzym DHFR, enzym xúc tác sự chuyển hóa dehydrofolat thành tetrahydrofolat. Để thu được mức biểu hiện cao, tế bào CHO thiếu hụt dhfr được chuyển nhiễm bằng vectơ biểu hiện chứa gen DHFR chức năng, cùng với gen mã hóa protein mong muốn. Trong trường hợp này, protein mong muốn là chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể tái tổ hợp.

Bằng cách làm tăng lượng chất ức chế cạnh tranh DHFR, methotrexat (MTX), các tế bào tái tổ hợp phát triển sức đề kháng bằng cách khuếch đại gen dhfr. Trong các điều kiện tiêu chuẩn, đơn vị khuếch đại được sử dụng này có kích thước lớn hơn rất nhiều kích thước của gen dhfr, và kết quả là, chuỗi nặng của kháng thể này cũng được khuếch đại.

Khi sản xuất protein trên quy mô lớn, như chuỗi kháng thể theo sáng chế, nếu muốn, cả mức biểu hiện lẫn độ ổn định của tế bào được sử dụng đều là các yếu tố

quyết định. Khi nuôi cấy trong một thời gian dài, các quần thể tế bào CHO tái tổ hợp mất tính ổn định về khả năng tạo ra kháng thể đặc hiệu trong quá trình khuếch đại, ngay cả khi chúng thu được từ một dòng bố mẹ duy nhất.

Các vectơ biểu hiện hai cistron được tao ra trước đó để sử dụng nhằm biểu hiện tái tổ hợp các kháng thể khảm. Các vectơ biểu hiện hai cistron này, sử dụng vị trí đi vào trong ribosom "internal ribosomal entry site - IRES." Trong các cấu trúc dùng để tạo ra kháng thể kháng EGFR dạng khảm này, các chuỗi của globulin miễn dịch và gen đánh dấu có thể chọn lọc, các cADN, liên kết với nhau thông qua IRES. IRES là các yếu tố tác động thu nhận các tiểu đơn vị ribosom nhỏ vào trong codon khởi đầu bên trong trong ARN thông tin với sự hỗ trợ của các yếu tố tác động trans của tế bào. IRES hỗ trợ việc biểu hiện hai hoặc nhiều protein từ đơn vị phiên mã đa cistron trong các tế bào nhân chuẩn. Việc sử dụng các vectơ biểu hiện hai cistron, trong đó gen đánh dấu có thể chọn lọc được dịch mã theo cách phụ thuộc vào mũ, và gen quan tâm theo cách phụ thuộc IRES, đã được áp dụng cho rất nhiều phương pháp thử nghiệm. Các yếu tố IRES đã được kết hợp thành công vào trong vectơ để biến nạp tế bào, tạo ra các động vật chuyển gen, sản xuất protein tái tổ hợp, bẫy gen và tạo đích gen.

Tóm lược cấu trúc kháng thể 806 khảm (ch806)

Kháng thể 806 khảm được tạo ra bằng cách tách dòng các chuỗi VH và VL của kháng thể 806 từ tế bào lai của chuột nhắt bố mẹ sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Các chuỗi VH và VL sau đó được tách dòng vào trong vectơ biểu hiện của động vật có vú pREN, cấu trúc của chúng được nêu trong SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8, và được chuyển nhiễm vào trong các tế bào CHO (DHFR-/-ve) để khuếch đại và biểu hiện. Tóm lược như sau, sau khi trypsin hóa 4×10^6 tế bào CHO được đồng chuyển nhiễm bởi 10 µg mỗi vectơ biểu hiện LC và HC bằng cách sử dụng kỹ thuật xung điện trong điều kiện chuẩn. Sau khi giữ 10 phút ở nhiệt độ phòng, các tế bào này được bổ sung vào 15 ml môi trường (10% huyết thanh bê, bổ sung hypoxanthin/thymidin cùng với các chất phụ gia) và chuyển vào đĩa petri nuôi cấy tế bào 15×10cm. Các đĩa này sau đó được đặt vào trong buồng ủ ở điều kiện bình thường trong 2 ngày.

Ở thời điểm này, việc bổ sung gentamyxin, methotrexat 5nM, thay thế huyết thanh bê bằng huyết thanh bê đã thẩm tách, và loại bỏ hypoxanthin/thymidin, bắt đầu

chọn lọc các dòng đã được chuyển nhiễm thành công bằng cả LC và HC từ môi trường. Vào ngày thứ 17 sau khi chuyển nhiễm, các dòng sinh trưởng riêng biệt được chọn lọc và sàng lọc sự biểu hiện kháng thể 806 dạng khảm. Thử nghiệm ELISA được sử dụng để sàng lọc và bao gồm việc phủ đĩa ELISA bằng thụ thể EGF tan và biến tính (thụ thể EGFR bị biến tính đã biết là liên kết với kháng thể 806). Thử nghiệm này cho phép sàng lọc các dòng riêng rẽ ứng với các mức sản xuất khác nhau, và cũng sàng lọc theo chức năng của kháng thể này. Tất cả các dòng đều thể hiện là tạo ra ch806 chức năng và dòng sản xuất tốt nhất được chọn và mở rộng để khuếch đại. Để khuếch đại mức ch806 được tạo ra, dòng có mức tạo ra kháng thể lớn nhất được chọn lọc tiếp trong methotrexat ở nồng độ cao hơn (100nM so với 5nM). Việc này được tiến hành bằng cách sử dụng các quy trình nêu trên.

Các dòng sinh trưởng trong môi trường MTX 100nM sau đó được chuyển đến Biological Production Facility, Ludwig Institute, Melbourne, Australia để xác định mức sản xuất kháng thể, loại bỏ huyết thanh, chuyển vào ngân hàng tế bào. Dòng tế bào này cho thấy tạo ra một lượng ổn định khoảng 10mg kháng thể/l trong các chai xoay.

Trình tự axit nucleic của vectơ pREN ch806 LC được nêu trong SEQ ID NO:7. Trình tự axit nucleic của vectơ pREN ch806 HC DHFR được nêu trong SEQ ID NO:8.

Fig.33 minh họa các vectơ pREN-HC và pREN-LC bằng cách sử dụng IRES. Hệ thống vectơ hai cistron pREN được mô tả và được công bố trong US 60/355,838 nộp ngày 13/2/2002.

ch806 được đánh giá bằng phân tích FACS để chỉ ra rằng ch806 có tính đặc hiệu liên kết giống như tính đặc hiệu liên kết của kháng thể gốc ở chuột nhắt. Phân tích này được tiến hành bằng cách sử dụng các tế bào kiểu dại (các tế bào gốc U87MG), các tế bào biểu hiện quá mức thụ thể EGF (các tế bào A431 và các tế bào UA87.wtEGFR) và các tế bào UA87.Δ2-7 (số liệu không được thể hiện). Tính đặc hiệu liên kết tương tự nhau giữa mAb806 và ch806 thu được sử dụng các tế bào biểu hiện quá mức EGFR và các tế bào biểu hiện d2-7 EGFR. Không có liên kết bất kỳ được quan sát thấy ở các tế bào kiểu dại. Phân tích Scatchard cho thấy liên kết ái lực đối với ch806 được đánh dấu phóng xạ là $6,4\times10^9$ M^{-1} khi sử dụng các tế bào U87MGde2-7 (số liệu không được thể hiện).

Phân tích kháng thể ch806 trong cơ thể (phân bố sinh học) được tiến hành trong chuột nhắt trụi lông BALB/c mang u ghép khác loài U87MG-de2-7, và kết quả được nêu trong Fig.34. Chuột được tiêm bằng 5μg kháng thể được đánh dấu phóng xạ và nhóm bao gồm bốn con chuột côn vào các thời điểm 8, 24, 48 và 74 giờ. Cắt lấy các cơ quan, xác định trọng lượng, và xác định hoạt tính phóng xạ trong máy đếm tia gama. ch806 được đánh dấu bằng ^{125}I làm giảm sự tạo đích đối với so với ch806 được đánh dấu bằng ^{111}In, có mức hấp thu ở u cao hơn và thời gian lưu lũy tiến ở u lớn hơn 74 giờ. Ở thời điểm 74 giờ, kháng thể được đánh dấu bằng ^{111}In có khoảng 30% ID/g mô và tỷ lệ u/máu là 4,0 (Fig.35). ch806 được đánh dấu bằng ^{111}In cho thấy một lượng kháng thể không đặc hiệu được lưu lại trong gan, lá lách và thận. Điều này là bình thường khi sử dụng isotyp này và lượng kháng thể nêu trên sẽ giảm dần theo thời gian, điều này cho thấy liên kết với ch806 là liên kết không đặc hiệu do liên kết với ^{111}In.

Kháng thể khảm ch806 được đánh giá hiệu quả điều trị trong mẫu u đã được ghép. 3×10^6 tế bào U87MG.Δ2-7 trong 100μl PBS được chủng dưới da vào cả hai bên sườn của chuột nhắt cái trụi lông từ 4 đến 6 tuần tuổi (Animal Research Center, Western Australia, Australia). mAb806 được sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả được minh họa trong Fig.36. Liệu trình điều trị được bắt đầu khi các khối u có thể tích trung bình đạt 50 mm^3 và sử dụng 1 mg ch806 hoặc mAb806 tiêm trong màng bụng với tổng 5 lần tiêm vào các ngày chỉ định. Thể tích u (mm^3) được xác định bằng công thức (chiều dài×chiều rộng^2)/2, trong đó chiều dài là trục dài nhất và chiều rộng là kích thước đo được vuông góc với chiều dài. Số liệu được biểu hiện dưới dạng thể tích trung bình của u ± độ lệch chuẩn đối với mỗi nhóm được điều trị. ch806 và mAb806 thể hiện hoạt tính kháng u đối với u U87MG.Δ2-7 ghép khác loại gần giống nhau.

Phân tích chức năng tác động miễn dịch của Ch806

Vật liệu và phương pháp

Kháng thể và dòng tế bào

mAb806 đơn dòng kháng de2-7 EGFR ở chuột nhắt, kháng thể khảm ch806 (IgG_1) và đối chứng là kháng thể đơn dòng dạng khảm tương thích lớp G250 từ cG250 được tạo ra tại Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia. Cả thử nghiệm về tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependant cytotoxicity - CDC) và tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular-cytotoxicity - ADCC) đều được sử dụng các tế bào

U87MG.de2-7 và các tế bào A431 làm các tế bào đích. Dòng tế bào U87MG.de2-7 được mô tả ở trên là dòng tế bào hình sao ở người được gây nhiễm bằng retrovirut chứa de2-7EGFR (Nishikawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 91, 7727-31). Các tế bào caxinom tế bào vảy A431 ở người được mua từ American Type Culture Collection (Manassas, VA). Các dòng tế bào này được nuôi cấy trong DMEM/F-12 cùng với Glutamax (Life Technologies, Melbourne, Australia) bổ sung 10% FCS đã bất hoạt bằng nhiệt (CSL, Melbourne, Australia), 100 đơn vị/ml penixilin và 100 µg/ml streptomyxin. Để duy trì sự chọn lọc đối với các tế bào U87MG.de2-7 được chuyển nhiễm retrovirut, môi trường còn chứa 400 µg/ml G418.

Tạo ra tế bào tác động đến các huyết bào đơn nhân ngoại biên ở người (human peripheral blood mononuclear cells - PBMC)

Các PBMC được phân lập từ máu của đối tượng cho tình nguyện khoẻ mạnh. Máu toàn phần sau khi được heparin hóa được phân đoạn bằng cách ly tâm theo tỷ trọng trên Ficoll-Hypaque (ICN Biomedical Inc., Ohio, USA). Các phần PBMC được thu nhận và rửa ba lần bằng $RPMI^+$ 1640 và bổ sung penxilin 100 U/ml và streptomyxin 100 µg/ml, L-Glutamin 2mM, chứa 5% FCS được bất hoạt bằng nhiệt.

Chuẩn bị tế bào đích

Các thử nghiệm CDC và ADCC được tiến hành bằng cách cải biến phương pháp đã được công bố trước đây (Nelson, D. L. et al. (1991) In: J. E. Colignan, A. M. Kruisbeek, D. D. Margulies, E. M. Shevach, và W. Strober (eds.), Current Protocols in Immunology, pp. 7.27,1. New York: Greene Publishing Wiley Interscience). Tóm lại, 5×10^6 tế bào đích U87MG.de2-7 và A431 được đánh dấu bằng 50 µCi ^{51}Cr (Geneworks, Adelaide, Australia) cho 1×10^6 tế bào và ủ trong 2 giờ ở 37°C. Các tế bào này sau đó được rửa ba lần bằng PBS (0,05M, độ pH=7,4) và lần thứ tư bằng môi trường nuôi cấy. Các phần (1×10^4 tế bào/50 µl) của các tế bào được bổ sung vào đĩa vi chuẩn độ 96 giếng (NUNC, Roskilde, Denmark).

Thử nghiệm CDC

Bổ sung ba lần 50 µl ch806 hoặc kháng thể đối chứng cùng lớp cG250 vào 50 µl các tế bào đích được đánh dấu với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,00315 - 10 µg/ml, và ủ trên nước đá 5 phút. Tiếp theo, bổ sung 50 µl bổ thể (huyết thanh) của đối tượng cho khỏe mạnh mới được thu nhận để thu được dịch pha loãng cuối cùng của huyết

thanh với tỷ lệ 1:3. Các đĩa vi chuẩn độ được ủ trong 4 giờ ở 37°C. Sau khi ly tâm, đếm ^{51}Cr được giải phóng vào trong dịch nổi (máy đếm tia gama tự ghi Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Tỷ lệ % làm tan tế bào đặc hiệu được tính toán theo lượng ^{51}Cr được giải phóng trong thử nghiệm, tổng lượng ^{51}Cr được giải phóng (50 µl tế bào đích + 100 µl 10% Tween 20) và lượng ^{51}Cr được giải phóng tự phát (50 µl tế bào đích + 100 µl môi trường).

Thử nghiệm ADCC

ADCC gây ra bởi ch806 bị tác động bởi PBMC của đối tượng cho khỏe mạnh, được xác định bằng thử nghiệm xác định lượng ^{51}lCr được giải phóng trong 4 giờ. Trong thử nghiệm ADCC thứ nhất, các tế bào đích đánh dấu được đặt vào các vi đĩa 96 giếng có đáy chữ "U" cùng với các tế bào tác động (NUNC, Roskilde, Denmark) với tỷ lệ tế bào tác động/tế bào đích (effector/target - E:T) là 50:1. Để xác định hoạt tính ADCC, kháng thể thử nghiệm ở khoảng nồng độ 0,00315 - 10 µg/ml (nồng độ cuối cùng) và kháng thể đối chứng được bổ sung vào từng giếng của ba lần. Trong thử nghiệm ADCC thứ hai, hoạt tính ADCC của ch806 được so sánh với mAb806 ở chuột nhắt bố mẹ theo tỷ lệ E:T và nồng độ kháng thể thử nghiệm không đổi ở 1 µg/ml. Trong cả hai thử nghiệm, các đĩa vi chuẩn độ được ủ ở 37°C trong 4 giờ, sau đó thu 50 µl từ mỗi giếng và xác định lượng ^{51}Cr được giải phóng bằng máy đếm tia gama (Cobra II automated Gamma Counter, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Các đối chứng được sử dụng trong các thử nghiệm này được hiệu chỉnh lượng ^{51}Cr giải phóng tự phát (chỉ có môi trường) và tổng lượng giải phóng (10% Tween20/PBS). Các đối chứng thích hợp trong cùng một phân nhóm kháng thể được tiến hành song song.

Tỷ lệ % làm tan tế bào (tính gây độc tế bào) được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ \% gây độc tế bào} = \frac{\text{Lượng đếm của mẫu - Lượng đếm do giải phóng tự phát}}{\text{Tổng lượng đếm - Lượng đếm do giải phóng tự phát}} \times 100$$

Tỷ lệ (%) gây độc tế bào được trình bày trên đồ thị điểm theo nồng độ của kháng thể (µg/ml).

Kết quả

Kết quả phân tích CDC được thể hiện trên Fig.37. Hoạt tính CDC tối thiểu quan sát được khi có mặt 10 µg/ml ch806 với mức CDC tương đương với mức quan sát được đối với đối chứng cùng lớp cG250.

ADCC gây ra bởi ch806 trên tế bào đích U87MG.de2-7 và tế bào đích A431 ở tỷ lệ E:T là 50:1 được nêu trong Fig.38. Tính gây độc tế bào đặc hiệu với ch806 đạt hiệu quả trên các tế bào đích U87MG.de2-7, nhưng ADCC ADCC gây ra bởi ch806 đạt giá trị nhỏ nhất trên các tế bào A431. Các mức gây độc tế bào thu được phản ánh số vị trí liên kết với ch806 trên hai quần thể tế bào. Các tế bào đích U87MG.de2-7 biểu hiện khoảng 1×10^6 de2-7EGFR được nhận biết đặc hiệu bởi ch806, trong khi đó chỉ có một tiểu phần bao gồm 1×10^6 phân tử EGFR kiểu dại được biểu hiện trên các tế bào A431 được nhận biết bởi ch806 (xem Ví dụ nêu trên).

Phân tích ADCC khác được tiến hành để so sánh ADCC gây ra bởi ch806 nồng độ 1 μg/ml trên các tế bào đích U87MG.de2-7 với ADCC gây ra bởi mAb806 ở chuột nhắt bố mẹ với nồng độ 1 μg/ml. Kết quả được nêu trên Fig.39. Việc khảm mAb806 đã có tác động cải thiện đáng kể ADCC thu được bằng mAb ở chuột nhắt bố mẹ với trên 30% gây độc chết tế bào bị ảnh hưởng ở tỷ lệ E:T nằm trong khoảng từ 25:1 đến 50:1.

Việc thiếu chức năng tác động miễn dịch của mAb806 ở chuột nhắt bố mẹ cải thiện đáng kể mức độ khảm hóa. ch806 điều chỉnh ADCC ở mức cao, nhưng lại cho hoạt tính CDC thấp.

Ví dụ 20. Tạo ra các kháng thể kháng genotyp của kháng thể khảm ch806

Để hỗ trợ việc đánh giá lâm sàng mAb806 hoặc ch806, cần tiến hành các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm để theo dõi dược động học huyết thanh của các kháng thể và định lượng các đáp ứng miễn dịch bất kỳ đối với kháng thể khảm chuột nhắt-người. Các kháng thể đơn dòng kháng genotyp (anti-ids) của chuột nhắt được tạo ra và đánh giá tính tương thích của nó với tư cách là thuốc thử trong thử nghiệm ELISA để xác định ch806 trong các mẫu huyết thanh gốc và sử dụng làm đối chứng dương trong các phân tích đáp ứng miễn dịch kháng thể khảm kháng người. Các kháng thể kháng genotyp có thể cũng hữu dụng làm vacxin để điều trị hoặc phòng ngừa gây ra đáp ứng kháng thể kháng EGFR tự nhiên ở bệnh nhân.

Các phương pháp tạo ra kháng thể kháng genotyp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Chatterjee et al., 2001; Uemura et al., 1994; Steffens et al., 1997; Safa và Foon, 2001; Brown và Ling, 1988).

Tóm lược, các kháng thể đơn dòng anti-ids của chuột nhắt được tạo ra như sau. Các tế bào lá lách từ chuột nhắt được gây miễn dịch bằng ch806 được dung hợp với các tế bào u tương bào SP2/0-AG14 và các tế bào lai tạo ra kháng thể này được lựa chọn thông qua thử nghiệm ELISA liên kết đặc hiệu với ch806 và liên kết cạnh tranh với kháng nguyên (Fig.40). 25 tế bào lai ban đầu được chọn và bốn trong số đó được ký hiệu là LMH-11, -12, -13 và-14, tiết ra các kháng thể biểu thị liên kết đặc hiệu với ch806, mAb806 và có khả năng trung hòa hoạt tính liên kết kháng nguyên ch806 hoặc mAb806 (Fig.41). Sự nhận biết idiotop của ch806/mAb806 hoặc vùng CDR được biểu thị bằng việc thiếu hoạt tính chéo với kháng thể IgG đa dòng ở người đã tinh chế.

Khi có mặt kháng nguyên tái tổ hợp de2-7 EGFR, mà có thể mua được trên thị trường, để hỗ trợ việc xác định ch806 trong các mẫu huyết thanh, thì khả năng của các kháng thể anti-ids ch806 đồng thời liên kết với các vùng biến đổi của kháng thể 806 được phát hiện ra trong thử nghiệm ELISA nhạy và đặc hiệu để xác định ch806 trong các mẫu lâm sàng (Fig.42). Sử dụng LMH-12 để bắt giữ và LMH-12 được biotin hóa để phát hiện, thử nghiệm ELISA được chấp thuận này cho thấy đường cong liên kết có tính ổn định cao nếu dùng để xác định ch806 (2 μg/ml – 1,6 ng/ml) trong huyết thanh với giới hạn phát hiện là 3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, hệ số biến đổi < 25%; 100 ng/ml-5 μg/ml, hệ số biến đổi < 15%). Không thấy có sự liên kết với nền được thể hiện ở huyết thanh thu từ ba đối tượng cho khỏe mạnh được thử nghiệm và liên kết không đáng kể được quan sát thấy với đối chứng cùng lớp hu3S193. Tế bào lai tạo ra kháng thể LMH-12 ở mức cao, và việc sản xuất trên quy mô lớn được lập kế hoạch cho phép xác định ch806 và định lượng đáp ứng miễn dịch bất kỳ trong các mẫu lâm sàng (Brown and Ling, 1988).

Kết quả

Gây miễn dịch chuột nhắt và chọn lọc dòng tế bào lai

Hoạt tính miễn dịch của các mẫu huyết thanh trước và sau khi gây miễn dịch cho thấy sự phát triển của hiệu giá cao của kháng thể kháng ch806 và kháng-huIgG ở chuột nhắt. Ban đầu chọn 20 tế bào lai tạo ra kháng thể mà liên kết với ch806, nhưng không liên kết với huIgG. Đặc tính liên kết của một vài trong số các tế bào lai này được nêu trong Fig.42A và 42B. Bốn trong số các tế bào lai này tạo ra kháng thể kháng-ch806 có ái lực liên kết cao (các dòng 3E3, SB8, 9D6 và 4D8) sau đó tiếp tục

được mở rộng dòng đối với các tế bào đơn bằng cách pha loãng giới hạn và được chỉ định bởi Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma ký hiệu là (LMH) -11, -12, -13 và-14, tương ứng (Fig.42).

Hoạt tính liên kết và phong bế của các kháng thể anti-ids được chọn

Khả năng liên kết đồng thời với hai kháng thể ch806 của các kháng thể kháng ch806 là một đặc tính mong muốn để sử dụng chúng làm thuốc thử trong thử nghiệm ELISA để xác định các mức ch806 trong huyết thanh. Các tế bào lai đã tách dòng, LMH-11, -12, -13, và-14 thể hiện khả năng liên kết đồng thời (số liệu không được thể hiện).

Sau khi mở rộng dòng, các dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào lai được xét nghiệm bằng thử nghiệm ELISA về khả năng trung hoà hoạt tính liên kết kháng nguyên ch806 hoặc mAb806 bằng sEGFR621. Kết quả cho thấy hoạt tính đối kháng của các kháng thể kháng genotyp LMH-11, -12, -13, và -14 với hoạt tính phong bế liên kết cả ch806 lẫn mAb806 ở chuột nhắt trong dung dịch với các đĩa phủ sEGFR (Fig.41 đối với LMH-11, -12, -13).

Sau khi nuôi cấy trên quy mô lớn hơn trong các chai xoay, tính đặc hiệu liên kết của các dòng tế bào lai đã mở rộng dòng, LMH-11, -12, -13, và -14 được xác nhận bằng thử nghiệm ELISA. Các kháng thể LMH-11 đến -14 được xác định là IgGlκ isotyp bằng bộ kit xác định isotyp của kháng thể đơn dòng của chuột nhắt.

Phát triển thử nghiệm ELISA dược động học để thử nghiệm mẫu huyết thanh lâm sàng chứa ch806

Để hỗ trợ việc xác định ch806 trong các mẫu huyết thanh, khả năng của các kháng thể ch806 kháng genotyp liên kết đồng thời với vùng biến đổi của kháng thể 806 của kháng thể 806 được phát hiện thấy khi phát triển thử nghiệm ELISA nhạy và đặc hiệu để xác định ch806 trong các mẫu lâm sàng. Ba dòng LMH-11, -12, và -13 đã tinh chế (Fig.49B và 49C, tương ứng) được so sánh về khả năng bắt giữ và sau đó, phát hiện liên kết với ch806 trong huyết thanh. Kết quả cho thấy sử dụng LMH-12 (10 μg/ml) dùng để bắt giữ và LMH-12 được biotin hóa để phát hiện tạo ra tính nhạy cao nhất đối với ch806 trong huyết thanh (3 ng/ml) với liên kết nền không đáng kể.

Đã thiết lập được các điều kiện ELISA dược động học tối ưu sử dụng kháng thể LMH-12 kháng isotyp nồng độ 1 μg/ml và LMH-12 được biotin hóa nồng độ 1 μg/ml

dùng để bắt giữ và phát hiện, tương ứng, tiến hành phương pháp này. Ba thử nghiệm ELISA độc lập được tiến hành với bốn bản giống nhau để xác định ch806 trong huyết thanh của nhóm ba đối tượng cho khỏe mạnh hoặc 1% BSA/môi trường có đối chứng cùng lớp hu3S193. Kết quả được thể hiện trên Fig.43 và cho thấy đường cong liên kết có tính ổn định cao dùng để xác định ch806 (2 μg/ml - 1,6 ng/ml) trong huyết thanh với giới hạn phát hiện 3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, Hệ số biến đổi < 25%; 100 ng/ml-5 μg/ml, Hệ số biến đổi < 15%). Không thấy có sự liên kết với nền được thể hiện ở huyết thanh thu từ ba huyết thanh được thử nghiệm và liên kết không đáng kể được quan sát thấy với đối chứng cùng lớp hu3S193.

Ví dụ 21. Đánh giá cấu trúc của hydratcacbon và việc nhận biết của kháng thể

Các thử nghiệm được tiến hành để đánh giá vai trò của các cấu trúc hydratcacbon trong liên kết và nhận biết EGFR, cả dạng được khuếch đại lẫn de2-7 EGFR, bằng mAb806.

Để xác định xem các cấu trúc của hydratcacbon có liên quan trực tiếp đến epitop của mAb806 hay không, tiến hành xử lý sEGFR được biểu hiện trong các tế bào CHO bằng PNGase F để loại bỏ sự glycosyl hóa ở vị trí N được liên kết. Sau khi xử lý, cho protein này chạy trên SDS-PAGE, chuyển lên màng và thẩm tách miễn dịch với mAb806 (Fig.44). Như mong đợi, sEGFR ở dạng loại bỏ sự glycosyl hóa chạy nhanh hơn trên SDS-PAGE. Điều này cho thấy các hydratcacbon đã được loại bỏ thành công. mAb806 rõ ràng liên kết với vật liệu loại bỏ glycosyl hóa, điều này cho thấy epitop của kháng thể về bản chất là peptit và không chỉ là epitop được glycosyl hóa.

Các dịch tan tế bào, được chuẩn bị từ các dòng tế bào được đánh dấu chuyển hóa bằng ^{35}S, được kết tủa miễn dịch với các kháng thể khác nhau định hướng vào EGFR (Fig.45). Như mong đợi, kháng thể 528 kết tủa miễn dịch tạo ba băng từ các tế bào U87MG.Δ2-7, băng trên tương ứng với EGFR kiểu dại và hai băng dưới tương ứng với d2-7 EGFR. Hai băng de2-7 EGFR này đã được báo cáo trước đây và được cho là đại diện cho các dạng glycosyl hóa khác nhau của EGFR (Chu et al. (1997) Biochem. J. Jun 15; 324 (Pt 3): 885-861). Ngược lại, mAb806 chỉ kết tủa miễn dịch tạo hai băng de2-7 EGFR với thụ thể kiểu dại biến mất hoàn toàn thậm chí ngay sau khi tiếp xúc (số liệu không được thể hiện). Điều đáng quan tâm là, mAb806 thể hiện hoạt tính tương đối tăng so với băng de2-7 EGFR dưới, nhưng hoạt tính thấp hơn với băng trên

khi so với kháng thể 528. Kháng thể SC-03, một kháng thể đa dòng thỏ mua được trên thị trường định hướng vào vùng đầu C của EGFR, kết tủa miễn dịch tạo ba băng EGFR giống như với kháng thể 528, mặc dù tổng lượng thụ thể được kết tủa miễn dịch bởi kháng thể này ít hơn đáng kể. Không thấy xuất hiện băng bất kỳ khi sử dụng kháng thể IgG2b không liên quan làm đối chứng cho mAb806 (xem Ví dụ 18).

Kháng thể 528 kết tủa miễn dịch tạo duy nhất một băng từ các tế bào U87MG.wtEGFR tương ứng với thụ thể kiểu dại (Fig.45). mAb806 cũng kết tủa miễn dịch tạo duy nhất một băng từ các tế bào này, tuy nhiên, băng EGFR này rõ ràng di chuyển nhanh hơn so với thụ thể phản ứng 528. Kháng thể SC-03 kết tủa miễn dịch tạo ra cả hai băng EGFR phản ứng từ các tế bào U87MG.wtEGFR, điều này khẳng định thêm rằng mAb806 và 528 nhận biết các dạng khác nhau của EGFR trong các dịch tan tế bào toàn phần được chuẩn bị từ các tế bào này.

Như được quan sát thấy đối với các tế bào U87MG.wtEGFR, kháng thể 528 kết tủa miễn dịch tạo duy nhất một băng EGFR từ các tế bào A431 (Fig.45). Băng EGFR này phản ứng với kháng thể 528 rất rộng trên các gel tỷ lệ thấp (6%) và có thể phản ánh tính đa dạng của việc glycosyl hóa thụ thể. Băng EGFR đơn cũng được quan sát thấy sau khi kết tủa miễn dịch bằng mAb806. Trong khi băng EGFR di chuyển không quá nhanh so với toàn bộ băng rộng phản ứng với kháng thể 528 và băng này lại nằm ở rìa trên của băng rộng 528 một cách ổn định. Không giống như dịch tan tế bào được chuẩn bị từ các tế bào U87MG.Δ2-7, tổng lượng EGFR được kết tủa miễn dịch bởi mAb806 từ dịch tan tế bào A431 là nhỏ hơn đáng kể so với lượng EGFR được kết tủa miễn dịch bởi kháng thể 528, một kết quả phù hợp với số liệu thu được từ phân tích Scatchard của các tác giả sáng chế đồng thời cho thấy mAb806 chỉ nhận biết một phần của EGFR trên bề mặt của các tế bào này (xem Ví dụ 4). Khi kết tủa miễn dịch bằng SC-03 sẽ tạo ra duy nhất một băng EGFR, nhưng rộng giống như của kháng thể 528. Kết quả tương tự cũng thu được đối với tế bào HN5 (số liệu không được thể hiện). Kết hợp các số liệu này thấy rằng mAb806 ưu tiên phản ứng với các loại EGFR di chuyển nhanh hơn, mà có thể là các dạng được glycosyl hóa khác nhau của thụ thể này.

Để xác định giai đoạn nào là giai đoạn thụ thể xuất hiện hoạt tính với mAb806, thử nghiệm tạo xung/theo dõi được tiến hành. Các tế bào A431 và U87MG.Δ2-7 được tạo xung trong 5 phút bằng ^{35}S methionin/xystein, sau đó được ủ ở 37°C trong các

khoảng thời gian khác nhau trước khi kết tủa miễn dịch bằng mAb806 hoặc 528 (Fig.46). Mô hình kết tủa miễn dịch ở các tế bào A431 bằng kháng thể 528 là đặc trưng đối với kháng thể phụ thuộc cấu hình đặc hiệu với EGFR. Một lượng nhỏ thụ thể được kết tủa miễn dịch ở 0 phút (nghĩa là, ngay sau khi tạo xung 5 phút) với lượng EGFR được đánh dấu tăng dần vào từng thời điểm. Trọng lượng phân tử của thụ thể này cũng đồng thời tăng theo thời gian. Ngược lại, vật liệu EGFR có hoạt tính với mAb806 có mặt ở mức cao ở 0 phút, cực đại ở 20 phút và sau đó, giảm vào những thời điểm tiếp theo. Do đó, dường như mAb806 ưu tiên nhận biết dạng EGFR được phát hiện thấy ở giai đoạn đầu của quá trình xử lý.

Hoạt tính với kháng thể được quan sát thấy ở các tế bào U87MG.Δ2-7 được đánh dấu và tạo xung có tính chất phức tạp hơn. Việc kết tủa miễn dịch bằng kháng thể 528 ở thời điểm 0 phút cho thấy một lượng nhỏ de2-7 EGFR của băng de2-7 EGFR dưới đã được đánh dấu (Fig.46). Lượng de2-7 EGFR có hoạt tính với kháng thể 528 thuộc băng dưới tăng theo thời gian, cao nhất ở 60 phút và giảm chậm dần ở 2 và 4 giờ. Không phát hiện thấy lượng de2-7 EGFR đáng kể được đánh dấu trong băng de2-7 EGFR trên cho tới 60 phút, sau khi lượng này tiếp tục tăng đến cuối thời điểm nghiên cứu. Điều này rõ ràng cho thấy băng de2-7 EGFR trên là dạng trưởng thành hơn của thụ thể. Hoạt tính của mAb806 cũng thay đổi trong suốt thời gian nghiên cứu, tuy nhiên ưu tiên kết tủa băng de27 EGFR dưới. Thực vậy, không quan sát thấy mức Ab806 tăng đáng kể ở băng trên cho đến 4 giờ sau khi đánh dấu.

Các thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng kháng thể mAb806 ưu tiên phản ứng với dạng glycosyl hóa chưa trưởng thành hơn của de2-7 EGFR và wtEGFR. Khả năng này được thử nghiệm bằng cách kết tủa miễn dịch EGFR từ các dòng tế bào khác nhau được đánh dấu qua đêm bằng ^{35}S methionin/xystein và sau đó, phân giải kết tủa thu được bằng enzym endoglycosidaza H (Endo H). Enzym này ưu tiên loại bỏ các hydratcacbon loại có hàm lượng manoza cao (nghĩa là, glycosyl hóa không hoàn toàn (chưa trưởng thành) từ các protein đồng thời vẫn giữ nguyên các hydratcacbon phức (nghĩa là, glycosyl hóa hoàn toàn). Kết tủa miễn dịch và phân giải bằng Endo H của các dịch tan tế bào U87MG.Δ2-7 được đánh dấu bằng kháng thể 528, mAb806 và SC-03 cũng cho kết quả tương tự (Fig.47).

Như được phỏng đoán, băng de2-7 EGFR ở dưới rất nhạy với sự phân giải bằng enzym Endo H, di chuyển nhanh trên SDS-PAGE sau khi phân giải bằng Endo H, điều này cho thấy băng này là dạng d2-7 EGFR có hàm lượng manoza cao. Băng de2-7 EGFR ở trên về cơ bản không bị Endo H phân giải, chỉ thể hiện sự khác biệt rất nhỏ trong di chuyển sau khi phân giải bằng Endo H, điều này cho thấy phần lớn cấu trúc hydratcacbon thuộc loại phức. Phân tử lượng của băng trên giảm với lượng nhỏ nhưng đều đặn sau khi phân giải bằng Endo H, điều này cho thấy rằng trong khi các hydratcacbon trong băng de2-7 EGFR trên phần lớn thuộc loại phức, thì có khả năng chúng là những cấu trúc có hàm lượng manoza cao. Điều đáng quan tâm là, các tế bào này cũng biểu hiện lượng wtEGFR nội sinh thấp mà lại dễ dàng phát hiện sau khi kết tủa miễn dịch bằng kháng thể 528. Phân tử lượng của thụ thể kiểu dại cũng giảm với lượng nhỏ, nhưng không đáng kể sau khi phân giải bằng Endo H, điều này cho thấy nó cũng chứa các cấu trúc có hàm lượng manoza cao.

Độ nhạy của wtEGFR được kết tủa miễn dịch với sự phân giải bằng Endo H là tương đương đối với cả hai loại tế bào U87MG.wtEGFR và A431 (Fig.47). Một lượng lớn nguyên liệu được kết tủa bởi kháng thể 528 không bị enzym Endo H phân giải mặc dù một lượng nhỏ nguyên liệu này ở dạng có hàm lượng manoza cao. Một lần nữa thấy rằng phân tử lượng của wtEGFR sau khi phân giải bằng Endo H giảm ít, điều này cho thấy rằng nó chứa một số cấu trúc có hàm lượng manoza cao. Kết quả sử dụng kháng thể SC-03 tương tự như kháng thể 528. Ngược lại, phần lớn lượng EGFR được kết tủa bởi mAb806 là nhạy với Endo H ở cả hai loại tế bào là U87MG.wtEGFR và A431, điều này khẳng định rằng mAb806 ưu tiên nhận biết dạng có hàm lượng manoza cao của EGFR. Kết quả tương tự cũng thu được đối với các tế bào HN-5, trong đó phần lớn nguyên liệu được kết tủa bởi mAb806 nhạy với sự phân giải bằng Endo H thì phần lớn vật liệu được kết tủa bởi mAb528 và SC-03 không bị Endo H phân giải (số liệu không được thể hiện).

Việc iot hóa bề mặt tế bào của dòng tế bào A43, được tiến hành với ^{125}I, sau đó kết tủa miễn dịch bằng kháng thể 806. Quy trình iot hóa bề mặt tế bào như sau: Làm tan tế bào, kết tủa miễn dịch, phân giải bằng enzym Endo H, SDS PAGE và chụp ảnh phóng xạ tự ghi như được mô tả ở trên. Để đánh dấu, các tế bào được sinh trưởng trong môi trường chứa 10% FCS, tách ra khỏi môi trường bằng EDTA, rửa hai lần bằng PBS, sau đó tái huyền phù trong 400 µl PBS (khoảng 2-3 x10^6 tế bào). Bổ sung

15 µl ^{125}I (dung dịch gốc 100 mCi/ml), 100 µl dung dịch gốc của enzym lactoperoxidaza ở bò (1 mg/ml), 10 µl H_2O_2 (dung dịch gốc 0,1%) vào huyền phù thu được ở trên và ủ trong 5 phút. Sau đó, bổ sung 10 µl H_2O_2 nữa và tiếp tục ủ trong 3 phút nữa. Sau đó, rửa lại các tế bào này 3 lần bằng PBS và làm tan trong Triton 1%. Iot hóa bề mặt tế bào dòng tế bào A431 bằng lactoperoxidaza, sau đó kết tủa miễn dịch bằng kháng thể 806, kết quả cho thấy, tương tự với dịch tan tế bào toàn phần được mô tả ở trên, dạng liên kết chủ yếu của EGFR được nhận biết bởi kháng thể 806 trên bề mặt tế bào của các tế bào A431 nhạy với sự phân giải bằng EndoH (Fig.48). Điều này khẳng định rằng dạng EGFR liên kết với kháng thể 806 trên bề mặt tế bào của các tế bào A431 là dạng nhạy với EndoH và do đó, nó thuộc loại có hàm lượng manoza cao.

Ví dụ 22. Kháng thể 806 được làm giống như của người (ngụy trang)

A. Cấu trúc hu806

Vectơ biểu hiện cho kháng thể 806 được làm giống như của người (hu806) được tạo cấu trúc. Vectơ này, được gọi là 8C65AAG (11891 bp; SEQ ID NO:41), được thiết kế để chứa cả hai gen cho hu806 có chiều dài đầy đủ trong catxet biểu hiện gen do trình tự khởi đầu GS đơn điều khiển (Fig.53 và 54).

Vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng ổn định của chuỗi nặng (CH) (SEQ ID NOS:42 và 43, tương ứng) được nêu trong Fig.55A, với CDR1, CDR2, và CDR3 trong VH (SEQ ID NO:44, 45, và 46, tương ứng) được gạch chân.

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VH) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ (CH) (SEQ ID NO:47 và 48, tương ứng) được nêu trong Fig.55B, với CDR1, CDR2, và CDR3 trong VH (SEQ ID NOS: 49, 50, và 51, tương ứng) được gạch chân.

Để thu được cấu trúc kháng thể 806 được làm giống như của người, sử dụng kỹ thuật ngụy trang (Daugherty et al. (1991) Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins. Axit nucleics Res. 19(9), 2471-6; US 6,797,492 cấp cho Daugherty; Padlan, E.A. (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol. Immunol. 28(4-5), 489-98; EP 519596, Padlan et al.,). Để giảm thiểu tính sinh miễn dịch của các vùng biến đổi của kháng thể 806, trong khi vẫn bảo toàn được các đặc tính liên kết với phối tử, tiến hành thay thế các gốc bị lộ ra

trên bề mặt trong các vùng khung làm khác với các gốc thường được tìm hiện thấy trong kháng thể ở người. Để thực hiện việc này, VL và VH của kháng thể đơn dòng (mAb) 806 của chuột nhắt được lắp ráp lại bằng kỹ thuật phương pháp tổng hợp gen và mồi PCR chồng lấn. Chuỗi CL (kappa) được lắp ráp theo cách tương tự. Để chứng minh sự bảo toàn các vị trí liên kết nguyên vẹn, vVL và vVH cũng được biểu hiện ở định dạng scFv mà cho thấy khả năng liên kết tốt với peptit tổng hợp chứa epitop kháng nguyên 806 bằng ELISA và với vùng ngoại bào (extracellular domain - ECD) của thụ thể EGF (EGFR) tái tổ hợp như được xác định bằng phép phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR)

v806VL và v806VH được lắp ráp thành IgG1 ở người có chiều dài đầy đủ bằng cách sử dụng kapa-LC được tối ưu hóa codon và vùng ổn định của chuỗi nặng của IgG1 ở người được tối ưu codon và vị trí ghép mới để thu được gen biểu hiện ổn định trong hệ thống tế bào NSO và CHO. Hệ thống biểu hiện này dựa trên hệ thống biểu hiện LONZA GS bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ pEE12.4 và pEE6.4 do LONZA Biologics cung cấp.

Sản phẩm kháng thể hu806 (Fig.55) thu được bằng cách biểu hiện tạm thời vectơ 8C65AAG được cho phản ứng với EGFR-ECD tái tổ hợp bằng SPR, và với epitop của peptit tổng hợp EGFR 806 bằng ELISA. Vectơ 8C65AAG được chuyển đến LICR Affiliate Christoph Renner (University of Zurich) để tạo ra các dòng tế bào GS-NS0 hu806 thích hợp và đến LICR, Melbourne Centre, để tạo ra các dòng tế bào GS-CHO hu806.

Chiến lược xây dựng cấu trúc, khuếch đại và tách dòng gen kháng thể hu806

Ngụy trang và tối ưu hóa codon

Việc ngụy trang kháng thể là chiến lược làm giống như của người nhằm ức chế các đáp ứng HAMA (kháng thể người kháng chuột nhắt). Các mAb của chuột nhắt được xem là các kháng nguyên "ngoại lai" đối với hệ miễn dịch của bệnh nhân và sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch ngay khi lần dùng đầu tiên, ngăn chặn việc sử dụng tiếp theo cho bệnh nhân đó. Trong bước đầu tiên của quy trình ngụy trang mAb806, các trình tự axit amin của VL và VH trong mAb806 được phân tích, và từng gốc axit amin trong trình tự protein mAb806 được phân cấp theo mức độ lộ diện trên bề mặt (Fig.56 và Fig.57). Chỉ có những axit amin nằm bên ngoài phân tử kháng thể này được coi là có thể cải biến được, vì chúng là các gốc axit amin duy nhất sẽ được các kháng thể nhận

biết. Sử dụng BLAST, trình tự protein mAb806 được so sánh với ba trình tự kháng thể ở người (VH36germ, CAD26810, và AAA37941). Đối với gốc axit amin bất kỳ trên bề mặt của mAb806 không tương ứng với trình tự chung của kháng thể ở người, thì gốc đó được xác định là bị thay đổi so với trình tự chung. Ban đầu, 12 axit amin trong VL và 14 axit amin trong VH của ch806 được ngụy trang (Fig.56 và Fig.57).

Tối ưu hóa codon là một phương pháp cải thiện mức biểu hiện dị tương đồng của các kháng thể hoặc các protein khác dựa trên khuynh hướng codon của các hệ thống được sử dụng để biểu hiện các kháng thể này. Một trong số những mục tiêu trong việc tạo ra hu806 là sử dụng việc tối ưu hóa codon để cải thiện mức biểu hiện đối với kháng thể này. Hệ thống biểu hiện này dựa trên hệ thống biểu hiện LONZA GS sử dụng vectơ biểu hiện pEE12.4 và pEE6.4 HC và LC được LONZA Biologics cung cấp và các tế bào NSO và/hoặc CHO làm các tế bào sản xuất. Do đó, các quyết định liên quan đến codon được sử dụng cho một axit amin nhất định được tạo ra dựa trên việc xem xét liệu codon có lợi trong các hệ thống biểu hiện NSO/CHO hay không.

Xây dựng cấu trúc và khuếch đại trình tự ADN 806 bằng PCR

Các trình tự cho các phiên bảo được ngụy trang, và tối ưu codon của VH và VL của kháng thể hu806 được tổng hợp theo cách sau đây: Đối với từng vùng (VH hoặc VL), 8-10 oligonucleotit được thiết kế dưới dạng đoạn mồi ngược và mồi xuôi chồng lấn. Các oligo này sẽ chồng lên nhau theo cách để bao phủ toàn bộ trình tự VH hoặc VL của hu806, bao gồm trình tự tín hiệu, các trình tự mã hóa, các intron, và bao gồm vị trí HindIII ở đầu 5' và vị trí 3' BamHI ở đầu 3'. Các bản đồ oligonucleotit được nêu trong Fig.56B và 57B, và chi tiết đoạn mồi được đề cập bên dưới.

Tóm lược, VH hoặc VL của hu806 được lắp ráp bằng PCR như sau: Ban đầu v806hc- hoặc v806lc- oligo 1, 2, 3, 4, oligo 5, 6, và oligo 7, 8, 9, 10 được kết hợp trong ba phản ứng riêng biệt. Các phần (50pmol) của mỗi oligo sườn, và 5pmol mỗi oligo bên trong được bổ sung vào 50 µl dung dịch phản ứng PCR chứa 25 µl 2×HotStar Taq Master Mix (Qiagen) và 48 µl nước không chứa nucleaza. Chu trình nhiệt như sau: 95°C; 15", (94°C; 30", 58°C; 30", 72°C; 30")× 20 chu trình, 72°C; 10", 4°C. Sản phẩm của ba phản ứng này được lấy ra sau đó tách bằng cách điện di trên gel. Sau đó, chúng được tinh chế bằng cách sử dụng cột muối (Qiagen-Qiaspin Minipreps), và kết hợp với nhau. Các sản phẩm này sau đó được khuếch đại bằng cách PCR sử

dụng các đoạn mồi 1 và 10. Sản phẩm của phản ứng thứ hai bao gồm các vị trí enzym giới hạn đối với HindIII và BamHI, cho phép xen vào trong các plasmit biểu hiện.

Các oligonucleotit được sử dụng để tổng hợp PCR các vùng V của hu806:

v806 VH:		SEQ ID NO:
v806hc -1:	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGACCTGGCGCATTC	52
v806hc -2:	CCCTTCCTCCTCACTGGGATTTGGCAGCCCCTTACCTGTGG CGGCTGCTACCAGAAAGAGAATGCGCCAGGTCCAATCC	53
v806hc -3:	CCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTCACCATCGAAGC CAGTCAAGGGGGCTTCCATCCACTCCTGTGTCTTCTCTAC	54
v806hc -4:	GACTCGGCTTGACAAGCCCAGGTCCACTCTCTTGGAGCTG CACCTGGCTGTGGACACCTGTAGAGAAGACACAGGAGTGG	55
v806hc -5:	GGGCTTGTCAAGCCGAGTCAAACTTTGTCCCTAACATGTAC TGTGTCCGGATACTCTATCTCATCAGATTTTGCGTGGAATTGG	56
v806hc -6:	CCCAGAGTATGATATGTAGCCCATCCATTCTAAACCTTTCCC TGGTGGCTGCCTTATCCAATTCCACGCAAAATCTGATG	57
v806hc -7:	GGGCTACATATCATACTCTGGGAACACCAGATATCAACCC TCTCTGAAAAGCCGGATCACAATCACTAGGGACACGTCG	58
v806hc -8:	GCAGTAATATGTTGCTGTGTCTGGGGCTGTAACGGAGTTC AGCTGCAGGAAGAACTGGCTCTTCGACGTGTCCCTAGTGATTG	59
v806hc -9:	CCAGACACAGCAACATATTACTGCGTAACCGCTGGCAGAG GCTTCCCCTATTGGGGACAGGGCACCCTAGTGACAGTGAGC	60
v806hc -10:	CACGGATCCATCTTACCGCTGCTCACTGTCACTAGGGTG	61
v806lc -1	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG	62
v806lc 2:	CTGGGATTTGGCAGCCCCTTACCTGTTGCGGCTGCTACAAG AAACAGTATTCTCCAAGTCCAATCCATGGTGGCGGCAAG	63
v806lc 3:	GGGGCTGCCAAATCCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGG TGACCATCGAAGCCAGTCAAGGGGGCTTCCATCCACTCC	64
v806lc 4:	CATGCTGGATGGACTCTGAGTCATCTGAATATCACTGTGA ACACCTGTAGAGAAGACACAGGAGTGGATGGAAGCCC	65
v806lc 5:	CTCAGAGTCCATCCAGCATGTCAGTCTCCGTGGGAGATAG GGTGACGATAACCTGTCATTCAAGCCAAGACATCAACTCC	66
v806lc 6:	GTTCCGTGATAGATTAGTCCTTTGAAGGACTTACCAGGCTT CTGTTGGAGCCATCCAATATTGGAGTTGATGTCTTGGCTTG	67
v806lc 7:	CAAAGGACTAATCTATCACGGAACAAACTTGGACGACGGCGT GCCATCGAGATTTTCAGGGTCTGGCAGCGGGACCGACTATAC	68
v806lc 8:	GTGCTGGACGCAGTAGTATGTGGCAAAGTCTTCTGGCTCT AAGCTAGAGATGGTCAGTGTATAGTCGGTCCCGCTG	69
v806lc -9:	CATACTACTGCGTCCAGCACGCTCAGTTCCCCTGGACATTC	70

v806 VH:		SEQ ID NO:
	GGCGGCGGCACAAAACTGGAAATCAAACGTGAGTAGGG	
v806lc 10:	CTCGGATCCCTACTCACGTTTGATTTCC	71

CL của hu806:

Phiên bản được tối ưu hóa codon của vùng ổn định của chuỗi nhẹ kapa (CL) được chuẩn bị theo cách tương tự như cách áp dụng cho các vùng biến đổi. Tuy nhiên, bước PCR đầu tiên liên quan đến đến việc tạo ra duy nhất hai sản phẩm sơ bộ sử dụng các oligo VKlcons- 1, 2, 3, 4; và 5, 6, 7, 8. Ngoài ra, các vị trí giới hạn bên sườn đối với sản phẩm này là BamHI và NotI trước khi được cài vào plasmit.

Các oligonucleotit được sử dụng để tổng hợp PCR các vùng CL của hu806:

v806 VH:		SEQ ID NO:
VK1cons-1	GACGGATCCTTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACG	72
VK1cons-2:	GGAGCTGCGACGGTTCCTGAGGAAAGAAGCAAACAG GATGGTGTTTAAGTAACAATGGCCACGTCATCCGACC CCCTC	73
VK1cons-3:	GGAACCGTCGCAGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCC ATCCGACGAGCAACTGAAGTCAGGCACAGCCTCCGTG GTG	74
VK1cons-4:	GTGCGTTGTCCACTTTCCACTGGACTTTGGCCTCTCTTG GGTAAAAGTTATTAAGGAGGCACACCACGGAGGCTGT GC	75
VK1cons-5:	GTGGAAAGTGGACAACGCACTACAGAGCGGGAACTCT CAGGAAAGCGTGACAGAGCAGGACTCAAAAGATTCA ACATACAGCC	76
VK1cons-6:	CTTCACAGGCATATACCTTGTGCTTTTCATAATCAGCT TTTGACAGTGTCAGGGTAGAAGATAGGCTGTATGTTG AATCTTTTGAGTC	77
VK1cons-7:	GCACAAGGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATCAGGGA CTCAGCAGCCCTGTCACTAAAAGTTTTAATAGAG	78
VK1cons-8:	CCTGCGGCCGCTTATCAGCATTCGCCTCTATTAAAACT TTTGGTGAGAGGG	79

CH của hu806:

Phiên bản tổng hợp, được làm giống như của người của vùng ổn định của chuỗi nặng (CH) của IgG1 (SEQ ID NO:80) được mua từ GeneArt, Regensburg, Germany.

Gen này là codon được tối ưu hóa để biểu hiện trong các tế bào CHO/NS0. Chi tiết trình tự gen này, các vị trí giới hạn, v.v., được nêu trong Fig.58.

Cấu trúc của các plasmit biểu hiện

Để gây nhiễm tạm thời và thử nghiệm sơ bộ, các trình tự VH và VL của hu806 được chuẩn bị theo cách như được mô tả ở trên, là các vectơ biểu hiện được tiếp hợp chứa các vùng ổn định di truyền. Các vectơ này, được LICR Affiliate Christoph Renner (University of Zurich, Switzerland) cung cấp, được biết là pEAK8 HC (chứa CH di truyền), và a33-xm-lc (chứa CL di truyền). Các vectơ được cắt bằng BamHI và HindIII trong điều kiện có mặt CIP, sau đó VH và VL của hu806 được tiếp hợp vào trong các vectơ tương ứng. Các plasmit thu được được sử dụng để biến nạp *E. coli* không cải biến hóa học Top10 (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. *E.coli* sau khi biến nạp được cấy lên các đĩa LB +Ampixilin, và các dòng kháng được sàng lọc bằng cách cắt bằng enzym giới hạn giới hạn và PCR. Thông thường, 8 dòng dương tính được phát hiện theo cách này sẽ được phân lập và tiếp theo được khuếch đại. ADN được tinh chế từ các thực thể này được phân tích bằng cách giải trình tự ADN tự động.

Các phiên bản được tối ưu hóa codon của các vùng ổn định được bổ sung vào các cấu trúc này bằng cách phân giải bằng enzym giới hạn và tiếp hợp bằng cách sửdụng BamHI và NotI. Các thể biến nạp này được chọn, giải trình tự, và phân tích như được đề cập ở trên. Trước khi các chuỗi của kháng thể có chiều dài đầy đủ được tiếp hợp vào hệ thống Lonza GS, vị trí BamHI giữa trình tự của vùng biến đổi và trình tự của vùng ổn định được cắt, trong một trường hợp được cắt bằng BamHI, gắn vào bằng cách sử dụng ADN Polymeraza, và nối đầu bằng.

Sau đó, các mảnh giới hạn chứa (VH + CH) của hu806 hoặc (VL + CL) của hu806 được cắt bằng NotI và tiếp đó bằng HindIII. Việc cắt này được thiết kế để tạo ra đầu bằng ở vị trí NotI, và do đó, được tiến hành theo thứ tự như sau: Đầu tiên, plasmit được cắt bằng NotI. Plasmit sau khi được cắt này (cắt lần một) được tách riêng bằng cách điện di sử dụng gel 1% agaroza. Sản phẩm này sau đó được lấy ra và tinh chế trên cột muối và nhân lên bằng cách sử dụng ADN Polymeraza. Sản phẩm của phản ứng này được tinh chế trên cột muối và sau đó, được cắt bằng HindIII. Sau đó, sản phẩm này (khoảng 1,3Kb đối với (VH + CH) của hu806, và khoảng 0,8 Kb đối với (VL + CL) của hu806 được tách bằng cách điện di trên gel, thu nhận và tinh chế.

Từng vectơ pEE12.4 và pEE6.4 (Lonza Biologics plc, Slough, UK) được cắt bằng HindIII và PmlI. (VH + CH) của hu806 được nối vào pEE12.4 để tạo ra pEE12.4-hu806H, và (VL + CL) của hu806 được nối với pEE6.4 để tạo ra pEE6.4-hu806L.

Sau khi sàng lọc, gen kép được gắn vào Lonzplasmit được tạo ra để chứa cả trình tự chuỗi nặng lẫn trình tự chuỗi nhẹ của hu806. Tóm tắt như sau, các vectơ pEE12.4-hu806H và pEE6.4-hu806L được cắt bằng các enzym giới hạn NotI và SalI. Các mảnh thu được, chứa đơn vị phiên mã GS và gen khởi đầu hCMV-MIE, sau đó là catxet biểu hiện chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của hu806, được tách riêng và nối với nhau. Lonzplasmit "kết hợp" thu được (được ký hiệu là 8C65AAG) được sử dụng để gây nhiễm tạm thời vào plasmit trong hệ thống HEK 293 và gây nhiễm thích hợp trong hệ thống NS0 và hệ thống CHO. Bản đồ plasmit được nêu trong Fig.53.

Các cải biến đối với cấu trúc

Trình tự khả biến xác nhận các trình tự axit amin của hu806 Hc và hu806 Lc được ngụy trang trên được so sánh với mAb806 trong Fig.59 và Fig.60, tương ứng. Trình tự của hu806 trong các phụ lục được đánh dấu (*) thể hiện các thay đổi ngụy trang ban đầu và số (1-8) chỉ các cải biến được đánh số từ 1 đến 8 như được đề cập ở đây.

Liên quan đến Fig.60, tệp tham chiếu (mAb806 LC) thể hiện không chính xác là Histidin (H), thay vì chính xác là Tyrosin (Y) ở vị trí 91; đối tượng của cải biến số 1 (#1). Trình tự tệp ban đầu, đề cập không chính xác trong Fig.60, để minh họa cho sự cần thiết của cải biến được tạo ra đối với hu806 ở vị trí 91.

Một số cải biến được tạo ra đối với trình tự ADN bổ trợ của hu806 sau giai đoạn thiết kế và giải trình tự ban đầu. Các lý do tiến hành các các cải biến này bao gồm: đưa vào 4 vị trí enzym giới hạn nhằm cải biến trình tự, để sửa 2 lỗi axit amin trong trình tự được đưa vào trong quá trình PCR, để sửa một lỗi axit amin phát sinh từ những tài liệu làm đối chứng cho mAb806, và để thao tác kỹ thuật 4 thay đổi axit amin khác mà ảnh hưởng đến các biến thể ngụy trang khác. Tiến hành 8 giai đoạn cải biến dưới đây:

1.hu806 VL: CDR3 H91Y

Tài liệu tạo ra các oligonucleotit nguyên gốc với thông tin không chính xác rằng có CAC (Histidin, H) ở vị trí 91 trong CDR3 của trình tự VL của mAb806. Phương

pháp gây đột biến điểm trực tiếp được sử dụng để tạo ra trình tự chính xác của TAC (Tyrosin, Y; Công bố đơn quốc tế số WO 02/092771). Kết quả thay đổi trình tự axit amin ở vị trí này là từ CVQHAQF (SEQ ID NO:84) đến CVQYAQF (SEQ ID NO:85). Trình tự ADN cuối cùng và trình tự protein đã dịch mã được so sánh với ch806 được nêu trong Fig.61.

Đoạn mồi xuôi để cải biến Histidin thành Tyrosin trong VL của hu806 (PDV1; 40 gốc)
5'- CCACATACTACTGCGTCCAGTACGCTCAGTTCCCCTGGAC -3' (SEQ ID NO:86)
Đoạn mồi ngược để cải biến Histidin thành Tyrosin trong VL của hu806 (PDV2; 20 gốc)
5'- CTGGACGCAGTAGTATGTGG -3' (SEQ ID NO:87)
2. Chuỗi nặng của hu806: Chèn vào vị trí giới hạn DraIII và FseI

Các vị trí enzym giới hạn được chèn vào các intron xung quanh vùng VL và VH của hu806. Các vị trí giới hạn này (duy nhất trong hệ thống vectơ pREN, LICR) được thiết kế để làm giảm quá trình tạo ra các cải biến đối với các catxet biểu hiện. Trình tự VH của hu806 không bao gồm vùng tín hiệu ban đầu, có thể được loại bỏ hoặc chèn vào bằng cách cắt một vị trí trên DraIII. Ngoài ra, FseI có thể được sử dụng, cùng với NotI (hệ thống pREN) hoặc EcoRI (hệ thống Lonza) để cắt bỏ vùng ổn định, thực hiện chức năng của BamHI từ trình tự gốc.

Các cải biến này thu được bằng cách sử dụng quy trình PCR hai bước. Các sản phẩm thu được sau đó được cắt bằng HindIII và BglII. Sau đó, chúng được nối vào các vectơ pREN chứa các vùng ổn định được tối ưu hóa, mà đã được cắt bằng HindIII và BamHI. Quy trình nối này phá hủy vị trí BamHI.

Đoạn mồi xuôi đối với vùng biến đổi ngược chiều với vị trí DraIII thứ nhất (ngược chiều với vị trí DraIII của chuỗi nặng của kháng thể 806; 26 gốc)
5'- GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG -3' (SEQ ID NO:88)
Đoạn mồi ngược kết hợp vào vị trí DraIII thứ nhất (xuôi chiều với vị trí DraIII của chuỗi nặng của kháng thể 806; 28 gốc)
5'- CACTGGGTGACTGGCTTCGATGGTGACC -3' (SEQ ID NO:89)
Đoạn mồi xuôi cho vùng biến đổi của HC giữa hai vị trí DraIII (ngược chiều với vị trí DraIII-FseI của chuỗi nặng của kháng thể 806; 49 gốc)

5’- GGTCACCATCGAAGCCAGTCACCCAGTGAAGGGGGCTTCCATCCACTC C-3’ (SEQ ID NO:90)

Đoạn mồi ngược kết hợp vào vị trí DraIII thứ hai, và vị trí FseI (xuôi chiều với vị trí DraIII-FseI của chuỗi nặng của kháng thể 806; 44 gốc)

5’- CCAAGATCTGGCCGGCCACGGTGTGCCATCTTACCGCTGCTCAC -3’ (SEQ ID NO:91)

3. Chuỗi nhẹ của hu806: Bổ sung các vị trí giới hạn RsrII và PacI

Đối với chuỗi nhẹ của hu806, các vị trí giới hạn được bổ sung là RsrII, có chức năng tương tự như DraIII trong chuỗi nặng, và PacI, tương ứng với chức năng của FseI.

Đoạn mồi xuôi đối với vùng biến đổi xuôi chiều với vị trí RsrII thứ nhất (ngược chiều với vị trí RsrII của chuỗi nhẹ của kháng thể 806; 22gốc)

5’- GAGAAGCTTGCCGCCACCATGG -3’ (SEQ ID NO:92)

Đoạn mồi ngược vào vị trí RsrII đầu tiên (xuôi chiều với vị trí RsrII của chuỗi nhẹ của kháng thể 806; 25 gốc)

5’- CGGTCCGCCCCCTTGACTGGCTTCG -3’ (SEQ ID NO:93)

Đoạn mồi xuôi cho vùng biến đổi của LC giữa hai vị trí RsrII (ngược chiều với vị trí RsrII-PacI của chuỗi nhẹ của kháng thể 806; 45 gốc)

5’- CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC -3’ (SEQ ID NO:94)

Đoạn mồi ngược kết hợp vào vị trí RsrII thứ hai, và vị trí PacI (xuôi chiều với vị trí RsrII-PacI của chuỗi nhẹ của kháng thể 806: 50 gốc)

5’- CCAAGATCTTTAATTAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTCCAGTTTTG -3’ (SEQ ID NO:95)

4. VH của hu806: ngụy trang lại P85A

Trình tự protein cho mAb806 bố mẹ ở VH với các axit amin từ 81 đến 87 là SVT**IE**DT (SEQ ID NO:96). Việc thay đổi isoLeuxin và axit glutamic ở vị trí 84 và 85 thành Alanin-Prolin để đọc thành SVTAPDT (SEQ ID NO:97; Fig.56) cũng là một phần của quy trình ngụy trang. Dựa vào các phương pháp phân tích khác, đã kết luận được rằng Alanin có thể có lựa chọn tốt hơn so với Prolin trong trường hợp này. Phương pháp gây đột biến điểm trực tiếp được sử dụng để tạo ra thay đổi thứ phát này

(SVTAADT, SEQ ID NO:98) bằng cách sử dụng đoạn mồi được liệt kê dưới đây. Trình tự ADN cuối cùng và protein đã dịch mã được nêu trong Fig.62.

Đoạn mồi xuôi (Fx3; 49 gốc)

5'- CTGCAGCTGAACTCCGTTACAGCCGCAGACACAGCAACATATTACTGC G -3' (SEQ ID NO:99)

Đoạn mồi ngược (Fx4; 49 gốc)

5'- CGCAGTAATATGTTGCTGTGTCTGCGGCTGTAACGGAGTTCAGCTGCAG -3' (SEQ ID NO:100)

5. hu806 VH: ngụy trang bổ sung

Trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng của hu806 trải qua ba đột biến khác sau lần ngụy trang đầu tiên: T70S, S76N và Q81K. Việc thay đổi ở vị trí 76 từ Serin thành Asparagin là trở lại đúng với trình tự ban đầu của phân tử mAb806. Các thay đổi khác trong vùng khung làm việc cũng được thực hiện do chúng là các gốc không được tìm thấy trong các kháng thể của chuột nhắt, nhưng lại được tìm thấy trong các kháng thể ở người. Do đó, trình tự protein TRDTSKSQFFLQ (SEQ ID NO:101) được ngụy trang thành SRDTSKNQFFLK (SEQ ID NO:102). Trình tự ADN cuối cùng và protein đã dịch mã so sánh với mAb806 được nêu trong Fig.62.

Đoạn mồi xuôi cho mảnh 5' PCR thuộc vùng biến đổi của HC (hu806HCfx2-5p-U; 49 gốc)

5'- GGTCACCATCGAAGCCAGTCACCCAGTGAAGGGGGCTTCCATCCACTC C -3' (SEQ ID NO:103)

Đoạn mồi ngược cho mảnh 5' PCR, kết hợp hai thay đổi ban đầu (hu806HCfx2-5p-D; 45 gốc)

5'- GATTCTTCGACGTGTCCCTTGAGATTGTGATCCGGCTTTTCAGAG -3' (SEQ ID NO:104)

Đoạn mồi xuôi cho mảnh 3' PCR, kết hợp tất cả các thay đổi (hu806HCfx2-3p-U; 55 gốc)

5'- CAAGGGACACGTCGAAGAATCAGTTCTTCCTGAAACTGAACTCCGTTAC AGCCGC -3' (SEQ ID NO:105)

Đoạn mồi ngược cho mảnh 3' PCR thuộc vùng biến đổi của HC (hu806HCfx2-3p-D; 44 gốc)

5’- CCAAGATCTGGCCGGCCACGGTGTGCCATCTTACCGCTGCTCAC -3’ (SEQ ID NO:106)

6. VL của hu806: ngụy trang E79Q

Đây là cải biến ngụy trang VL duy nhất sau khi xây dựng cấu trúc được được tiến hành. Phương pháp gây đột biến điểm trực tiếp tại vị trí 79 được sử dụng để hiệu chỉnh trình tự SSLEPE (SEQ ID NO:107) thành SSLQPE (SEQ ID NO:108). Kết quả so sánh trình tự ADN cuối cùng và protein đã dịch mã với ch806 được nêu trong Fig.61.

Đoạn mồi xuôi mảnh 5’ PCR thuộc vùng biến đổi của LC (hu806LC-5p-U; 45 gốc)

5’- CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC -3’ (SEQ ID NO:109)

Đoạn mồi ngược cho mảnh 5’ PCR, kết hợp đột biến điểm (hu806LC-5p-D; 34 gốc)

5’- CTCTGGTTGTAAGCTAGAGATGGTCAGTGTATAG -3’ (SEQ ID NO:110)

Đoạn mồi xuôi cho 3’ PCR thuộc vùng biến đổi của LC kết hợp đột biến điểm (hu806LC-3p-U; 45 gốc)

5’- CCATCTCTAGCTTACAACCAGAGGACTTTGCCACATACTACTGCG -3’ (SEQ ID NO:111)

Đoạn mồi ngược cho 3’ PCR thuộc vùng biến đổi của LC (hu806LC-3p-D; 50 gốc)

5’- CCAAGATCTTTAATTAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTCCAGTTTTG -3’ (SEQ ID NO:112)

7. Chuỗi nhẹ của hu806: cải biến ghép-nối thuộc vùng ổn định của chuỗi kapa

Đột biến điểm này cần để hiệu chỉnh lỗi trong việc ghép phiên bản được tối ưu hóa codon của vùng ổn định của chuỗi kapa. Trước khi đột biến, một phần của chuỗi axit amin bắt đầu bằng VYACEVTH (SEQ ID NO:113) và tiếp tục đến hết phân tử không được bao gồm trong kháng thể cuối cùng(Fig.60).

Đoạn mồi xuôi cho mảnh 5’ PCR của vùng ổn định của chuỗi nhẹ kapa (F1; 21 gốc)

5’- GGCGGCACAAAACTGGAAATC -3’ (SEQ ID NO:114)

Đoạn mồi ngược cho mảnh 5’ PCR của vùng ổn định của chuỗi nhẹ kappa, kết hợp sửa (F2; 59 gốc)

5' - GATGAGTTACTTCACAGGCATATACTTTGTGCTTTTCATAATCAGCTTTT GACAGTGTC - 3' (SEQ ID NO:115)

Đoạn mồi xuôi cho mảnh 3’ PCR của vùng ổn định của chuỗi nhẹ kappa, kết hợp sửa (F3; 26 gốc)

5’- AGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATC -3’ (SEQ ID NO:116)

Đoạn mồi ngược mảnh 3’ PCR của vùng ổn định của chuỗi nhẹ kapa. (F4; 17 gốc)

5' - GCCACGATGCGTCCGGC - 3' (SEQ ID NO:117)

8. hu806 VH: N60Q

Ngoài ra các thay đổi ngụy trang được tạo ra đối với kháng thể 806 trong các giai đoạn đầu của việc của việc xây dựng cấu trúc, Asparagin tại vị trí 60 trong VH CDR2 được thay thành Glutamin ở thời điểm này. N-Glycosyl hóa theo sơ đồ: N X S/T, trong đó X là axit amin bất kỳ. Trình tự axit amin từ vị trí 60 là N P S, theo sơ đồ này. Tuy nhiên, thỉnh thoảng Prolin (như trong ví dụ nêu theo sáng chế) hoặc xystein được tìm thấy tại vị trí X để N-glycosyl hóa. Nó có thể liên quan đến việc glycosyl hóa không thích hợp có thể làm thay đổi hoạt tính của kháng thể này. Do đó, Asparagin bị loại bỏ, và thay thế bằng axit amin có mối liên hệ gần nhất của nó, Glutamin, từ đó loại bỏ khả năng vị trí này bị glycosyl hóa (Fig.59 và Fig.62).

Liên kết của cấu trúc 8C65AAG của kháng thể hu806 được ngụy trang

Việc gây nhiễm tạm thời các tế bào 293FT bằng plasmit cuối cùng 8C65AAG được tiến hành cho phép chuẩn bị một lượng nhỏ hu806 để xác nhận liên kết kháng nguyên ban đầu. Dịch nổi của môi trường nuôi cấy từ một vài lần chuyển nhiễm tạm thời nhân với lượng nhỏ được thu nhận lại, phân lập và thu kháng thể hu806 bằng cách sử dụng bước chạy sắc ký protein-A. Khoảng 1-2 µg kháng thể hu806 thu được như được xác định bằng ELISA định lượng huIgG1 và kháng thể này được phân tích bằng Biacore về kháng nguyên liên kết với EGFR-ECD tái tổ hợp (Fig.63). Globulin miễn dịch của bò từ môi trường nuôi cấy tế bào cùng được tinh chế với hu806 và chủ yếu chứa IgG tổng số, đánh giá lượng giới hạn của liên kết hu806.

Giải trình tự các đoạn mồi

RenVecUPSTREAM: Đoạn mồi xuôi, bắt đầu giải trình tự ngược chiều của vùng biến đổi ở đỉnh 8 và vectơ a33xm.

5’- GCACTTGATGTAATTCTCCTTGG -3’ (SEQ ID NO:118)

RenVecDwnstrmHC: Đoạn mồi ngược bắt đầu giải trình tự xuôi dòng của vùng biến đổi trên plasmit chuỗi nặng đỉnh 8. Ghép bên trong vùng ổn định của HC không được tối ưu hóa codon.

5'- GAAGTAGTCCTTGACCAGG -3' (SEQ ID NO:119)

RenVecDwnstrmLC: Đoạn mồi ngược, bắt đầu giải trình tự xuôi dòng của vùng biến đổi trên plasmit chuỗi nhẹ a33-xm-lc. Ghép bên trong vùng ổn định của LC không được tối ưu hóa codon.

5'- GAAGATGAAGACAGATGGTGCAG -3' (SEQ ID NO:120)

Upstrm Lonza: Đoạn mồi xuôi, bắt đầu giải trình tự ngược chiều của vùng biến đổi trong các vectơ Lonza, pEE 12,4 và pEE 6,4. Không thể sử dụng với Lonza kết hợp do đây là vùng kép trong plasmit kết hợp.

5'- CGGTGGAGGGCAGTGTAGTC -3' (SEQ ID NO:121)

Dnstrm 6-4: Đoạn mồi ngược, bắt đầu giải trình tự xuôi dòng của vùng ổn định trong vectơ Lonza pEE 6,4

5'- GTGATGCTATTGCTTTATTTG -3' (SEQ ID NO:122)

Dnstrm 12-4: Đoạn mồi ngược, bắt đầu giải trình tự xuôi dòng của trong vectơ Lonza pEE12.4

5'- CATACCTACCAGTTCTGCGCC -3' (SEQ ID NO:123)

Cod-Opt LC const E: Đoạn mồi xuôi, bên trong vùng ổn định của chuỗi nhẹ v-kappa được tối ưu hóa codon

5'- CCATCCTGTTTGCTTCTTTCC -3' (SEQ ID NO:124)

Cod-Opt LC const F: Đoạn mồi ngược, bên trong vùng ổn định của chuỗi nhẹ v-kappa được tối ưu hóa codon

5'- GACAGGGCTGCTGAGTC -3' (SEQ ID NO:125)

806HCspec: Đoạn mồi xuôi, bên trong và duy nhất đối với phiên bản được ngụy trang của vùng biến đổi của HC của kháng thể 806

5'- GTGCAGCTCCAAGAGAGTGGAC -3' (SEQ ID NO:126)

806LCspec: Đoạn mồi xuôi, bên trong và duy nhất đối với phiên bản được ngụy trang của vùng biến đổi của LC của kháng thể 806

5'- CAGAGTCCATCCAGCATGTC -3' (SEQ ID NO:127)

Trình tự được định dạng theo chuẩn của GenBank và các chú thích của plasmit 8C65AAG mã hóa IgG1 hu806 được nêu trong Fig.64.

Fig.53 được tạo ra bằng cách sử dụng vectơ NTI (Invitrogen).

Fig.59-62 được tạo ra bằng cách sử dụng vectơ NTI AlignX.

Thảo luận

Việc ngụy trang cho kháng thể thụ thể kháng EGF, kháng thể 806 liên quan đến sự đột biến 14 axit amin trong VH (Fig.59 và Fig.62), và 12 thay đổi đối với chuỗi VL (Fig.60 và Fig.61) với việc tối ưu hóa codon như được chỉ định để biểu hiện trong tế bào động vật có vú CHO hoặc NS0. Vectơ chứa gen kép cuối cùng, được ký hiệu là 8C65AAG, đã được xác nhận về mặt trình tự, và trình tự mã hóa và dịch mã được kiểm tra lại. Liên kết với vùng ngoại bào của EGFR tái tổ hợp được khẳng định bằng các phân tích Biacore sử dụng sản phẩm hu806 được biểu hiện tạm thời.

Các dòng đơn thích hợp tạo ra kháng thể hu806 nguyên vẹn ở mức cao được chọn trong môi trường không chứa glutamin như được LONZA khuyến cáo. Các dòng thích hợp được nuôi trong môi trường không bổ sung huyết thanh để tạo ra các canh trường nuôi cấy không chứa huyết thanh.

B. Phân tích đặc tính của hu806 *in vitro* và *in vivo*

Các thể chuyển nhiễm GS-CHO thích hợp để tạo ra hu806 với lượng cao, 14D8, 15B2 và 40A10 và thể chuyển nhiễm GS-NS0 hu806 36 được phát triển và các canh trường nuôi cấy trên quy mô nhỏ được nghiên cứu để tinh chế và phân tích đặc tính của sản phẩm hu806 ban đầu. Kết quả cho thấy các đặc tính hóa lý tương tự nhau. Do đó, các thùng nuôi cấy có cánh khuấy quy mô lớn hơn (15L) được sử dụng để nuôi cấy các thể chuyển nhiễm có mức sản xuất kháng thể lớn (GS-CHO hu806 40A10) và sản phẩm sau khi tinh chế được nghiên cứu trong các nghiên cứu phân tích đặc tính *in vitro* và liệu pháp *in vivo* trong mô hình ghép khác loại U87MG.de2-7 và A431.

Phương pháp và kết quả

Sản xuất và xử lý xuôi chiều:

Quy mô nhỏ

Các thử nghiệm trong các bình lắc được tiến hành trong các bình lắc E500 chứa 100mL thể tích canh trường nuôi cấy tế bào. Fig.76 thể hiện khả năng sống sót của tế bào và các biểu đồ sản xuất kháng thể của bốn thể chuyển nhiễm trong canh trường. Nồng độ sản phẩm được xác định bằng ELISA sử dụng kháng thể kháng genotyp 806 LMH-12 (Liu et al. (2003) Generation of anti-idiotype antibodies for application in clinical immunotherapy laboratory analyses. Hybrid Hybridomics. 22(4), 219-28) làm

kháng thể phủ, và ch806 Clinical Lot: J06024 làm chuẩn. Nguyên liệu khi thu hoạch được ly tâm và dịch nổi được lọc qua bộ lọc 0,2 μm, sau đó các kháng thể này được tinh chế theo ái lực bằng sắc ký Protein-A.

Quy mô lớn

Dòng tế bào chuyển nhiễm CHO-K1SV biểu hiện hu806, dòng tham gia thử nghiệm 40A10 được nuôi cấy trong bình phản ứng sinh học có cánh khuấy dung tích 15L kèm theo cung cấp glucoza trong 16 ngày sử dụng CD-CHO (Invitrogen)/25 μM L-Methionine sulfoximin (MSX; Sigma)/ chất bổ sung GS (Sigma) làm môi trường bazơ. Fig.76C là tốc độ phát triển của tế bào và mức sản xuất theo thể tích trong bình phản ứng sinh học có cánh khuấy dung tích 15L. Hiệu suất cuối cùng là 14,7L ở nồng độ 58 mg/L bằng ELISA.

Nguyên liệu khi thu hoạch được ly tâm và dịch nổi được lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 μm, sau đó cô đến thể tích 2L bằng cách sử dụng màng 2×30K trong máy cô Pall Centrimate. Các phần (4×500ml) sau đó được chuyển lên cột protein A 250mL và rửa giải bằng 50mM xitrat độ pH=4,5 chứa 200mM NaCl. Kháng thể sau khi rửa giải và tinh chế lại bốn lần được thu nhận, sau đó cô và thẩm tích trong PBS, độ pH=7,4.

Sản phẩm hu806 từ quá trình nuôi cấy trên quy mô nhỏ và lớn được định lượng bằng OD A280nm. Mẫu kháng thể này được thu hồi từ rProtein-A, sau đó được đánh giá bằng sắc ký loại theo kích thước (Size Exclusion Chromatography - SEC) (quy mô nhỏ, Fig.77; quy mô lớn, Fig.78), 4-20% Tris-Glyxin SDS-PAGE trong các điều kiện đã được khử hoặc chưa được khử (Fig.79-81), và tiến hành xác định điểm đẳng điện bằng hệ thống điện di Amersham Multiphor II trên đĩa Ampholine PAG (pH 3,5-9,5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Fig.82).

Các kháng thể hu806 khi được tinh chế theo ái lực trên cột Protein-A có các đỉnh protein đối xứng và profin rửa giải SEC giống với kháng thể ch806 được sử dụng làm chuẩn trong lâm sàng. Profin của kháng thể này khi chạy trên gel SDS-PAGE cũng phù hợp với profin của globulin miễn dịch. Mô hình IEF cho thấy có ba đồng chức năng với pI nằm trong khoảng từ 8,66 đến 8,82 và khoảng này phù hợp với giá trị pI theo tính toán (8,4) cho trình tự protein.

Phân tích liên kết

Phân tích FACS

Các giá trị ước tính của nồng độ kháng thể được xác định cho từng mẫu với OD A280 nm được sử dụng để phân tích FACS với các tế bào A431 thuộc dòng tế bào caxinom thượng thận (có sự khuếch đại gen EGFR). Các tác giả sáng chế trước đây đã phát hiện ra rằng mAb806 liên kết với khoảng 10% trong số khoảng 2×10^6 wtEGFR được biểu hiện trên các tế bào u A431 so với mAb528 đặc hiệu với wtEGFR (Johns et al. (2002) Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. Int. J. Cancer. 98(3), 398-408). Các tế bào của một trong số bốn mẫu hu806 được nhuộm màu, kháng thể IgG2b không liên quan, hoặc kháng thể ch806 làm đối chứng dương; từng mẫu được đánh giá ở nồng độ là 20μg/ml. Đối chứng chỉ chứa kháng thể thứ hai (IgG dê kháng người (đặc hiệu với Fc) FITC được dung hợp). Đường cong liên kết FACS hỗn hợp được nêu trong Fig.83 và cho thấy có sự nhuộm màu tương đương nhau đối với tất cả các cấu trúc.

Đặc tính liên kết tế bào của hu806, mẫu 40A10 được tạo ra bằng cách nuôi cấy trên quy mô lớn cũng được đánh giá bằng phân tích FACS về khả năng liên kết với các tế bào A431 cũng như các tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7 biểu hiện biến thể EGFRvIII của thụ thể EGFR (Johns et al., 2002). Kết quả điển hình của hai phân tích giống nhau được nêu trong Fig.84 và Fig.85, tương ứng. Các đối chứng bao gồm kháng thể IgG2b không liên quan (các biểu đồ màu đen), ch806 hoặc 528 (liên kết với cả EGFR kiểu dại lẫn de2-7 EGFR) như đã thể hiện.

Kháng thể ch806 và kháng thể hu806 thể hiện sự nhuộm màu tương đương đối với dòng tế bào A431 và dòng tế bào U87MG.de2-7, điều này hỗ trợ cho phát hiện trước đây rằng mAb806 nhận biết đặc hiệu d2-7 EGFR và một tiểu phần EGFR được biểu hiện quá mức (Luwor et al. (2001) Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. Cancer Res. 61(14), 5355-61). Như mong đợi, kháng thể 528 nhuộm màu cả dòng tế bào U87MG.de2-7 lẫn dòng tế bào A431 (Fig.84 và 85).

Phân tích liên kết tế bào

Khả năng liên kết với kháng nguyên của thể dung hợp miễn dịch phóng xạ được đánh giá bằng các thử nghiệm hấp thụ tế bào ((Lindmo et al. (1984) Determination of

the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immunol. Methods. 72(1), 77-89) sử dụng dòng tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7 và các tế bào caxinom biểu bì A431 biểu hiện gen EGFR được khuếch đại.

Các phần phản ứng miễn dịch của thể dung hợp phóng xạ của hu806 và ch806 được xác định bằng liên kết với các tế bào biểu hiện kháng nguyên khi có mặt kháng nguyên với lượng quá mức. Kết quả liên kết của thể dung hợp phóng xạ ^{125}I-hu806 và ^{125}I-ch806 với tế bào U87MG.de2-7 được nêu trong Fig.86A với khoảng nồng độ tế bào nằm trong khoảng từ 20×10^6 đến $0,03\times10^6$ tế bào/mẫu. Kết quả liên kết của thể dung hợp phóng xạ ^{125}I-hu806 và ^{125}I-ch806 với tế bào A431 được nêu trong Fig.86B với khoảng nồng độ tế bào nằm trong khoảng từ 200×10^6 đến $0,39\times10^6$ tế bào/mẫu.

Các phân tích Scatchard được sử dụng để tính toán hằng số phân ly (*K*a) (Lindmo et al., 1984). Liên kết của một mình kháng thể được đánh dấu ở mức thấp (20 ng) được so sánh với liên kết khi có mặt kháng thể không được đánh dấu với lượng quá mức. Phần phản ứng miễn dịch được tính đến khi tính toán lượng kháng thể không phản ứng như được mô tả trước đây (Clarke et al. (2000) In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice. Cancer Res. 60(17), 4804-11) và liên kết đặc hiệu (nM; tổng số kháng thể × % kháng thể liên kết) được thể hiện bằng đồ thị dựa trên liên kết đặc hiệu/không phản ứng (Fig.87 và 88). Hằng số phân ly được xác định từ hệ số góc âm của đường này.

Ái lực liên kết của ^{125}I-hu806 liên kết EGFRvIII trên các tế bào U87MG.de2-7 xác định được là $1,18\times10^9$ M^{-1}. Ka của ^{125}I-ch806 là $1,06\times10^9$ M^{-1}. Kết quả này phù hợp với kết quả đã được thông báo về giá trị Ka đối với ^{111}In- và ^{125}I-ch806 lần lượt là $1,36\times10^9$ M-1 và $1,90\times10^9$ M^{-1}, giá trị này gần như tương đương với giá trị của mAb806 ở chuột nhắt bố mẹ là $1,1\times10^9$ M^{-1} (Panousis et al. (2005) Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. Br. J. Cancer. 92(6), 1069-77).

Phân tích Scatchard đối với tế bào A431 thể hiện ái lực liên kết cao với cả hai cấu trúc 806 với một quần thể nhỏ EGFR trên các tế bào này. Ka của ^{125}I-ch806 là $0,61\times10^9$ M^{-1}; và của ^{125}I-hu806 là $0,28\times10^9$ M^{-1}.

Phân tích cảm ứng sinh học

Phân tích cảm ứng sinh học được tiến hành trên cảm ứng sinh học BIAcore 2000 sử dụng chip cảm biến được phủ carboxymetyldextran (CM5). Chip này được tạo dẫn xuất trên kênh 3 bằng peptit epitop của kháng thể 806 (EGFR axit amin 287-302; SEQ ID NO:14; xem US 11/060,646, nộp ngày 17/2/2005; US 60/546,602, nộp ngày 20/2/2004; và US 60/584,623, nộp ngày 1/7/2004), sử dụng hóa chất và amin chuẩn. Kênh 2 được tạo dẫn xuất bằng kháng thể đối chứng được sử dụng để xác định tính phù hợp của hệ thống. Kênh 1 được tạo dẫn xuất bằng etanolamin và được sử dụng làm kênh đối chứng trắng để hiệu chỉnh các ảnh hưởng đến chỉ số khúc xạ. Các mẫu của hu806 được pha loãng trong đệm HBS (HEPES10 mM, độ pH=7,4; NaCl 150 mM; di-Na-EDTA 3,4 mM; Tween-20 0,005%), và các phần (120 µl) có nồng độ 50nM, 100nM, 150nM, 200 nM, 250 nM và 300 nM được tiêm lên trên bề mặt chip cảm biến với tốc độ dòng 30 µl/phút. Sau khi tiêm, theo dõi sự phân ly bằng cách cho đệm HBS chảy trên bề mặt chip trong 600 phút. Kháng thể ở dạng liên kết được rửa giải và bề mặt chip được tái tạo giữa các mẫu bằng cách tiêm 20µl dung dịch natri hydroxit 10mM. Đối chứng dương, chứa ch806. Các hằng số liên kết được xác định bằng cách sử dụng mô hình cân bằng liên kết của phần mềm đánh giá BIA. Fig.89 thể hiện sơ đồ cảm biến được tạo ra.

Liên kết phụ thuộc liều lượng được quan sát thấy đối với cả kháng thể hu806 và lẫn kháng thể được sử dụng làm đối chứng dương, ch806, trên kênh 3. Tính phù hợp của hệ thống được khẳng định bằng liên kết phụ thuộc liều lượng của kháng thể đơn dòng thích hợp với kênh đối chứng 2. Không phát hiện thấy kháng thể hu806 (hoặc kháng thể ch806) phản ứng chéo với kháng thể đối chứng. Các phân tích của các tác giả sáng chế đã xác định rằng K_D khả biến (1/Ka) là 37 nM đối với kháng thể hu806 và 94 nM đối với kháng thể ch806.

Phân tích tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể

Phân tích ADCC được tiến hành bằng cách sử dụng chế phẩm 40A10 chứa kháng thể hu806 đã tinh chế có đích là các tế bào caxinom thượng thận A431 và mới phân lập từ các tế bào tác động đơn nhân trong máu ngoại biên ở đối tượng cho khỏe mạnh. Tóm lược như sau, tất cả phép phân tích được tiến hành làm ba bản sao với 1) 1 µg/ml từng kháng thể với tỷ số tế bào tác động/tế bào đích (E:T = từ 0,78:1 đến 100:1) và

cũng 2) ở E:T = 50:1 với khoảng nồng độ của từng kháng thể (3,15 ng/ml - 10 µg/ml). Các đối chứng cùng lớp của kháng thể, tính gây độc tự phát và tổng mức độ gây độc tế bào được bao gồm trong ba bản sao và tính gây độc tế bào đặc hiệu được tính theo công bố trước đó (Panousis et al., 2005). Kết quả được nêu trong Fig.90.

Kháng thể hu806 thể hiện ổn định hoạt tính ADCC tốt hơn nhiều so với kháng thể khảm ch806 IgG1. Trong thử nghiệm đại diện đã nêu, kháng thể hu806 ở nồng độ 1 µg/mL ảnh hưởng đến ADCC 30 % mức độ gây độc tế bào so với mức độ gây độc tế bào 5% của kháng thể ch806.

Nghiên cứu trị liệu bằng kháng thể 806 *in vivo*

Hiệu lực điều trị của kháng thể hu806 được nghiên cứu bằng cách sử dụng u caxinom thượng thận ghép khác loại A431 hoặc u thần kinh đệm ghép khác loại U87MG-de2-7 đã được ghép ở chuột nhắt trụi lông BALB/c. Để tạo ra các u ghép khác loài, chuột được tiêm vào dưới da vào đường thoái vị bẹn phải và trái bằng 1×10^6 tế bào caxinom thượng thận A431 hoặc 1×10^6 tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7 trong 100 µl PBS. Thể tích u (tumor volume - TV) được tính bằng công thức ((chiều dài × chiều rộng^2)/2), trong đó chiều dài là trục dài nhất và chiều rộng là số đo vuông góc với chiều dài. Trong thử nghiệm đầu tiên, các nhóm gồm 5 con chuột nhắt trụi lông BALB/c (n= 10 u/nhóm'/;l) được ghép u ghép khác loài A431 hoặc U87MG.de2-7 được nhận chế độ điều trị bằng 1 mg/kháng thể hu806, hoặc 1 mg kháng thể ch806 hoặc đối chứng là tá dược PBS bằng cách tiêm IP. Việc điều trị được tiến hành vào ngày 6, 8, 11, 13, 15 và 18 đối với u ghép khác loài A431, và ngày 4, 6, 8, 11, 13 và 15 đối với dòng tế bào U87MG.de2-7, tương ứng. Thể tích u giá trị trung bình ± SEM cho đến khi kết thúc các thử nghiệm do các đánh giá theo thể tích u được nêu trong Fig.91 đối với u ghép khác loài A431 cho đến ngày thứ 25, và trong Fig.92 đối với các u ghép khác loài U87MG.de2-7 cho đến ngày thứ 31.

Các đánh giá trị liệu *in vivo* bằng hu806 cho thấy có một sự giảm phát triển đáng kể của u ghép khác loài A431 so với đối chứng sử dụng tá dược PBS. Đường cong phát triển của u ghép khác loài A431 được quan sát đối với hu806 tương đồng cao với nhóm điều trị bằng ch806. Trong u U87MG.de2-7 ghép khác loại đã được ghép, đối tượng ở nhóm đối chứng sử dụng PBS bị giết vào ngày thứ 20. Liệu pháp hu806 cho thấy sự phát triển của u giảm đáng kể vào ngày thứ 20 so với đối chứng sử dụng PBS

(P<0,001), và tiếp tục làm chậm sự phát triển của u sau ngày thứ 20 tương tự như nhóm sử dụng ch806.

Thảo luận

Kháng thể hu806 được tinh chế theo ái lực trên Protein A thể hiện profin rửa giải SEC giống nhau so với ch806 được sử dụng làm nguyên liệu chuẩn trong lâm sàng, và profin gel SDS-PAGE phù hợp với globulin miễn dịch. Mô hình IEF phù hợp với giá trị pI được phỏng đoán trước là 8,4.

Thông qua phân tích liên kết tế bào Scatchard và phân tích epitop bằng cảm biến sinh học kháng thể hu806 thể hiện các đường cong liên kết và các thông số ái lực có mức tương đồng cao so với kháng thể ch806. Ái lực liên kết của hu806 và ch806 với EGFRvIII và mức EGFR kiểu dại được biểu hiện quá mức tương tự nhau và nằm trong khoảng nanomol thấp. Kết quả về liên kết tế bào thu được từ phân tích FACS củng cố cho các phát hiện này.

Ngoài ra, hu806 thể hiện ADCC được cải thiện đáng kể trên cấu trúc ch806 đối với các tế bào A431 dương tính đối với kháng nguyên đích.

Các đánh giá trị liệu *in vivo* bằng hu806 cho thấy sự giảm phát triển đáng kể của u ghép khác loài A431 so với nhóm điều trị bằng ch806. Trong U87MG.de2-7 u ghép khác loài đã được ghép, liệu pháp hu806 cho thấy sự phát triển của u giảm đáng kể vào ngày thứ 20 so với đối chứng sử dụng PBS (P<0,001), và tiếp tục làm chậm sự phát triển của u sau ngày thứ 20 tương tự như nhóm sử dụng ch806.

Ví dụ 23. Kháng thể đơn dòng 175

Như được đề cập trong Ví dụ 1, dòng 175 (IgG2a) được chọn để tiếp tục phân tích đặc tính.

a. Vật liệu và phương pháp

Các dòng tế bào

Dòng tế bào U87MG.Δ2-7 (Huang et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 2927-2935) và dòng tế bào A431 (Ullrich et al. (1984) Nature. 309, 418-425) được chuyển nhiễm Δ2-7EGFR như kỹ thuật đã được mô tả trước đây. Dòng tế bào DU145 không phụ thuộc hormon tuyến tiền liệt (Mickey et al. (1977) Cancer Res. 37, 4049-4058) thu được từ ATCC (atcc.org).

Tất cả các dòng tế bào nêu trên được giữ trong môi trường DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) chứa 10% FCS (CSL, Melbourne), 2 mM Glutamin (Sigma Chemical Co, St.Louis) và penxilin/streptomyxin (Life Technologies, Grand Island). Ngoài ra, dòng tế bào U87MG.Δ2-7 được giữ trong Geneticin nồng độ 400mg/ml (Life Technologies, Inc, Grand Island). Dòng tế bào BaF/3 (Palacios et al. (1984) Nature. 309, 126-131) và dòng tế bào BaF/3 biểu hiện các thụ thể EGF khác nhau (Walker et al. (2004) J. Biol. Chem. 2(79), 22387-22398) thường được giữ trong môi trường RPMI 1640 (GIBCO BRL) được bổ sung 10% huyết thanh bê (GIBCO BRL) và 10% WEHI-3B môi trường điều hòa (Ymer et al. (1985) Nature. 19-25;317, 255-258) làm nguồn IL-3. Tất cả các dòng tế bào được sinh trưởng ở 37°C trong không khí chứa 5% CO_2.

Các kháng thể và các peptit

mAb806 và mAb175 được tạo ra tại Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), chi nhánh New York và được tạo ra và tinh chế tại Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne). Dòng tế bào nguyên bào sợi của chuột nhắt $NR6_{\Delta EGFR}$ được sử dụng làm kháng nguyên. Các tế bào lai của chuột nhắt được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột BALB/c 5 lần dưới da với khoảng thời gian giữa các lần gây miễn dịch là từ 2- đến 3- tuần, bằng 5×10^5- 2×10^6 tế bào trong tá dược. Tá dược Freund hoàn chỉnh được sử dụng cho lần tiêm đầu tiên. Sau đó, Tá dược Freund không hoàn chỉnh (Difco) được sử dụng. Các tế bào lá lách từ chuột đã gây miễn dịch được dung hợp với SP2/0 dòng tế bào u tủy của chuột nhắt. Dịch nổi của các dòng mới được tạo ra được sàng lọc bằng các thử nghiệm hấp thụ hồng cầu dựa trên hoạt tính với dòng tế bào NR6, $NR6_{wtEGFR}$, và $NR6_{\Delta EGFR}$ và sau đó, phân tích bằng các thử nghiệm hấp thụ hồng cầu với các dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm U87MG, $U87MG_{wtEGFR,}$ và $U87MG_{\Delta EGFR}$ ở người.

Các mAb nguyên vẹn (50 mg) được phân giải trong PBS bằng papain hoạt hóa trong 2-3 giờ ở 37°C với tỷ lệ 1:20 và enzym papain này được bất hoạt bằng iotaxetamit. Sau đó, sản phẩm phân giải được nạp lên cột Protein-A sepharose (Amersham) trong đệm natri phosphat 20mM, độ pH = 8,0, với dòng được tinh chế thêm bằng cách trao đổi ion sử dụng cột Mono-S (Amersham). Sau đó, protein này được cô bằng cách sử dụng máy cô ly tâm 10.000 MWCO (Millipore). Đối với các

phức Fab-peptit, bổ sung peptit đông khô với lượng mol dư vào Fab và ủ trong 2 giờ ở 4°C trước khi cài đặt các thử nghiệm kết tinh.

Lập bản đồ mAb175 bằng cách sử dụng các mảnh EGFR được biểu hiện trong các tế bào động vật có vú

Vào ngày trước khi gây nhiễm bằng các mảnh này, các nguyên bào sợi thận-phôi 293T ở người được cấy với mật độ 8×10^5/giếng trong các đĩa nuôi cấy mô 6 giếng chứa 2 ml môi trường. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng 3-4 µg plasmit ADN được tạo phức bằng Lipofectamine 2000 (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trong khoảng từ 24 đến 48 giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường nuôi cấy tế bào được hút ra, và các tế bào đơn lớn được làm tan trong 250 µl đệm dung giải (Triton X-100 l%, glyxerol 10%, NaCl 150mM, HEPES 50mM, độ pH=7,4, EGTA 1mM và hỗn hợp ức chế enzym proteaza hoàn chỉnh (Roche). Các phần của dịch tan tế bào (l0-15 µl) được trộn với đệm mẫu SDS chứa β-mercaptoetanol 1,5%, được làm biến tính bằng cách gia nhiệt trong 5 phút ở 100°C và xung điện trên gel 10% NuPAGE Bis-Tris polyacrylamit (Invitrogen). Sau đó, các mẫu được điện chuyển lên các màng nitroxenluloza, sau đó rửa trong đệm TBST (Tris-HCl 10mM, độ pH=8,0, NaCl 100mM và Tween-20 0,1%) và phong bế trong TBST chứa 2,5% sữa gầy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Các màng được ủ qua đêm ở 4°C với mAb175 0,5 µg/ml trong đệm phong bế. Các màng song song được dò qua đêm bằng mAb 9B11 (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) để phát hiện c-myc epitop. Các màng được rửa trong TBST, và ủ trong đệm phong bế chứa IgG thỏ kháng chuột nhắt được dung hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Biorad) với tỷ lệ pha loãng 1:5000 trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Các vết thẩm tách sau đó được rửa trong TBST, và hiện màu sử dụng màng tự chụp bằng tia phóng xạ, sau đó ủ với cơ chất phát quang hóa học Western Pico (Pierce, Rockford, Illinois).

Lập bản đồ mAb175 sử dụng các mảnh EGFR được biểu hiện trong tế bào động vật có vú và nấm men

Một nhóm gồm các mảnh EGFR xuyên màng được gắn đuôi c-myc chồng lấn, bắt đầu ở các gốc 274, 282, 290 và 298 và tất cả kết thúc ở axit amin 501 và dung hợp với hormon sinh trưởng bằng kỹ thuật đã được mô tả trước đây (Johns et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375-30384). Việc biểu hiện các protein EGFR trên bề mặt tế bào nấm men được tiến hành như đã mô tả (Johns et al., 2004).

Tóm tắt như sau, các thực thể đã biến nạp được sinh trưởng ở 30°C trong môi trường tối thiểu chứa nấm men nitơ bazơ, casein hydrolysat, dextroza, và đệm phosphat độ pH=7,4, trên nền lắc khoảng một ngày cho đến khi OD_{600} đạt 5-6. Sau đó, các tế bào nấm men được gây cảm ứng để biểu hiện protein bằng cách chuyển vào môi trường tối thiểu chứa galactoza, và được ủ kèm theo lắc trong 30°C trong 24 giờ. Sau đó, các canh trường được bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích. Dịch lỏng chứa u thô chứa kháng thể đơn dòng c-myc 9E10 thu được từ Covance (Richmond, CA). 1×10^6 tế bào nấm men được rửa bằng đệm FACS được làm lạnh bằng nước đá (PBS chứa 1 mg/ml BSA) và được ủ với ascites kháng-c-myc (tỷ lệ pha loãng 1:50), hoặc kháng thể đơn dòng EGFR ở người (10 µg/ml) trong thể tích cuối cùng là 50 µl, trong 1 giờ ở 4°C. Các tế bào này sau đó được rửa bằng đệm FACS được làm lạnh bằng nước đá và được ủ với IgG kháng chuột nhắt được đánh dấu phycoerythrin (tỷ lệ pha loãng 1:25), trong thể tích cuối cùng là 50 µl trong 1 giờ ở 4°C, tránh ánh sáng. Sau đó, rửa các tế bào nấm men này bằng đệm FACS được làm lạnh bằng nước đá, dữ liệu tín hiệu huỳnh quang được thu bằng máy đếm dòng tế bào Coulter Epics XL (Beckman-Coulter) và phân tích bằng phần mềm đếm tế bào WinMDI (J. Trotter, Scripps University). Để xác định các epitop thẳng so với epitop cấu hình, các tế bào nấm men được gia nhiệt ở 80°C trong 30 phút, sau đó làm lạnh trên đá 20 phút trước khi đánh dấu bằng các kháng thể. Một nhóm các thể đột biến EGFR được liệt kê trong Bảng 7 đã được mô tả trước đây (Johns et al., 2004).

Cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore)

BIAcore 3000 được sử dụng cho tất cả các thử nghiệm. Các peptit chứa epitop của Ab806 giả định được cố định trên chip cảm biến CM5 sử dụng kết hợp amin, thiol hoặc Pms ở tốc độ dòng là 5 µl/phút (Wade et al. (2006) Anal. Biochem. 348, 315-317). mAb806 và mAb175 được chảy qua bề mặt cảm biến ở tốc độ dòng 5 µl/phút ở 25°C. Các bề mặt được tái tạo giữa các lần chạy bằng cách tiêm HCl 10mM ở tốc độ dòng là 10 µl/phút.

Kết tủa miễn dịch và thẩm tách Western

Tế bào được dung giải bằng đệm dung giải (Triton X-IOO 1%, HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, 4-(2-aminoetyl) benzensulfonylflorua 500 mM, aprotinin 150 nM, chất ức chế proteaza E-64 1 mM, EDTA 0,5 mM, và leupeptin 1 mM, độ pH=7,4) trong 20

phút, làm trong bằng cách ly tâm ở 14.000 x g trong 30 phút, kết tủa miễn dịch bằng các kháng thể liên quan với nồng độ cuối đạt 5 µg/ml trong 60 phút và giữ bằng các hạt Sepharose-A qua đêm. Sau đó, các mẫu được rửa giải bằng 2X đệm mẫu NuPAGE SDS (Invitrogen), phân giải trên gel NuPAGE (3-8% hoặc 4-12%), điện chuyển lên màng vận chuyển Immobilon-P (Millipore), sau đó dò bằng các kháng thể liên quan trước khi phát hiện bằng bằng phóng xạ phát quang hóa học tự ghi.

Hóa mô miễn dịch

Các lát cắt đông lạnh được nhuộm màu bằng mAb175 5 µg/ml hoặc đối chứng cùng lớp không liên quan trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Kháng thể ở dạng liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng hệ thống phát hiện Dako Envision+ HRP theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cuối cùng các lát cắt này được rửa bằng nước, nhuộm đối màu bằng hematoxylin và đếm.

Các mô hình ghép khác loại

Các tế bào U87MG.Δ2-7 (3×10^6) trong 100 µL PBS được chủng dưới da vào hai sườn chuột nhắt cái trụi lông Balb/c từ 4 đến 6 tuần tuổi (Animal Research Centre, Perth, Australia). Tất cả nghiên cứu được tiến hành bằng cách sử dụng các mô hình u đã được ghép như kỹ thuật được nêu trong tài liệu (Perera et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11, 6390-6399). Liệu trình điều trị bắt đầu ngay sau khi các khối u đạt thể tích trung bình được thể hiện trong phần chú thích hình thích hợp. Thể tích u (mm^3) được xác định bằng công thức (chiều dài × chiều rộng^2)/2, trong đó chiều dài là trục dài nhất và chiều rộng là số đo được của trục vuông góc với chiều dài. Số liệu được thể hiện dưới dạng thể tích u ± SE đối với mỗi nhóm điều trị. Tất cả số liệu được phân tích ý nghĩa bằng phép thử Student-T một biến khi $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Dự án nghiên cứu này được Animal Ethics Committee của bệnh viện Austin chấp thuận.

Sản xuất và phân tích đặc tính các dòng tế bào thích hợp biểu hiện các cấu trúc đột biến của EGFR

Các đột biến của wtEGFR được tạo ra bằng cách sử dụng kit gây đột biến điểm trực tiếp (Stratagene, La Jolla, CA). Mẫu cho từng đột biến là cADN EGFR ở người (số truy cập x00588) (Ullrich et al. (1984) Nature. 309, 418-425). Việc giải trình tự nucleotit tự động từng cấu trúc được tiến hành để khẳng định tính toàn vẹn của các đột

biến EGFR. EGFR kiểu dại và đột biến (C173A/C281A) được chuyển nhiễm vào tế bào BaF/3 bằng cách xung điện.

Các dòng tế bào thích hợp biểu hiện EGFR đột biến thu được bằng cách chọn lọc trong môi trường chứa neomyxin. Sau bước chọn lọc cuối cùng, ARN thông tin được phân lập từ mỗi dòng tế bào, được phiên mã ngược và trình tự EGFR được khuếch đại bằng PCR. Tất cả các đột biến trong EGFR được biểu hiện được khẳng định bằng cách giải trình tự các sản phẩm PCR. Mức biểu hiện EGFR được xác định bằng phép phân tích FACS trên FACStar (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ) sử dụng kháng thể kháng EGFR mAb528 (Masui et al. (1984) Cancer Res. 44, 1002-1007; Gill et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7755-7760) ở nồng độ 10 µg/ml trong PBS, FCS 5%, EDTA 5 mM, sau đó là Ig kháng chuột nhắt được đánh dấu bằng Alexa 488 (tỷ lệ pha loãng cuối cùng l:400). Cường độ huỳnh quang nền được xác định bằng cách ủ các tế bào này với kháng thể ban đầu không liên quan, tương thích về nhóm. Tất cả các tế bào này được cấy chuyển bình thường trong môi trường được điều hòa RPMI, 10% FCS, 10% WEHI3B và 1,5 mg/ml G418.

Hoạt hóa EGFR đột biến theo EGF

Các tế bào biểu hiện wtEGFR hoặc C271A/C283A-EGFR được rửa và ủ trong 3 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh hoặc IL-3. Thu nhận tế bào bằng cách ly tâm và được tái huyền phù trong môi trường chứa EGF (100 ng/ml) hoặc thể tích tương đương PBS. Các tế bào này được thu hoạch sau 15 phút, tạo viên lắng và làm tan trực tiếp trong đệm mẫu SDS/PAGE chứa p-mercaptoetanol. Các mẫu được tách trên các gel gradient NuPAGE 4-12%, được chuyển lên màng Immobilon PVDF và được dò bằng kháng thể kháng phosphoTyrosin (4G10, Upstate Biotechnologies) hoặc kháng thể kháng EGFR (mAb806, được tạo ra ở LICR). Các băng phản ứng được phát hiện bằng phản ứng quang hóa.

Tác động của EGF và các kháng thể đến sự tăng sinh của tế bào

Các tế bào sinh trưởng ở pha log được thu hoạch và rửa hai lần bằng PBS để loại bỏ IL-3 dư. Các tế bào được tái huyền phù trong RPMI 1640 bổ sung 10% FCS và cấy trên đĩa 96 giếng với mật độ 10^5 tế bào/tế bào hoặc là chỉ với chất mang hoặc cùng EGF với khoảng nồng độ tăng dần. Nếu thích hợp, mAb528 hoặc mAb806 với nồng độ cố định (2 µg/giếng) được bổ sung vào canh trường. Mức tăng sinh được xác định

sử dụng thử nghiệm MTT (van de Loosdrecht et al. (1994) *J. Immunol. Methods.* 174, 311-320).

Hoạt tính với các kháng thể đặc hiệu cấu hình

Các tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm và nhuộm màu bằng kháng thể đối chứng hoặc kháng thể thử nghiệm (tất cả ở nồng độ 10 µg/ml trong đệm FACS trong 40 phút trên nước đá, rửa trong đó đệm FACS), sau đó là Ig kháng chuột nhắt được đánh dấu bằng Alexa 488 (tỷ lệ pha loãng cuối là 1:400, 20 phút trên nước đá). Các tế bào này được rửa bằng đệm FACS được làm lạnh bằng nước đá, thu nhận bằng cách ly tâm, và phân tích trên FACScan; kênh phát ánh sáng huỳnh quang lớn nhất được xác định cho mỗi mẫu bằng cách sử dụng công cụ thống kê trong Cell Quest (Becton and Dickinson). Cường độ huỳnh quang nền (đối chứng âm) được trừ đối với tất cả các phép đo. Cường độ huỳnh quang trung bình được chọn là hình dạng đỉnh và cường độ ánh sáng huỳnh quang tiêu biểu nhất và được sử dụng để tính toán tỷ lệ mAb806 so với mAb528 ở dạng liên kết.

Xác định cấu trúc tinh thể của các phức chất peptit Fab 175, Fab 806 và Fab-peptit và cấu trúc NMR của epitop của peptit 806 trong dung dịch

Các cấu trúc được xác định bằng cách thay thế nguyên tử và tinh chế được đồng quy với R=0,225/Rfree=0,289 cho Fab806 và R=0,226/Rfree=0,279 cho Fab806:peptit;

R=0,210/Rfree=0,305 cho Fab806 và R=0,203/Rfree=0,257 cho Fab806:peptit,

Các tinh thể của Fab 806 tự nhiên được kết tinh bằng cách khuếch tán hơi giọt treo sử dụng Fab nồng độ 10mg/ml và bình chứa chứa đệm natri axetat 0,1M, độ pH=4,6, PEG6000 6,6-8% và isopropanol 15-20%. Để thu số liệu, các tinh thể được chuyển vào dung dịch bảo vệ đông lạnh (ngăn các tinh thể bị phá hủy khi đông lạnh) chứa đệm natri axetat 0,1M, độ pH=4,6, PEG6000 10% và isopropanol 15-20%, và glyxerol 10%. Sau đó, các tinh thể này được ghép lên một vòng nylon và đông lạnh nhanh trực tiếp trong nitơ lỏng.

Các tinh thể của phức Fab 806-peptit được kết tinh bằng cách khuếch tán hơi giọt treo sử dụng phức Fab-peptit nồng độ 10mg/ml và bình chứa chứa amoni axetat 0,2M, PEG 5,000 monometylete 16-18%, chất lượng của tinh thể sau đó được cải thiện bằng

các kỹ thuật tạo mầm. Để thu số liệu, các tinh thể được chuyển vào dung dịch bảo vệ đông lạnh được chứa trong bình chứa được bổ sung 25% glyxerol. Sau đó, các tinh thể này được ghép lên một vòng nylon và đông lạnh nhanh trực tiếp trong nitơ lỏng.

Các tinh thể của phức Fab 175 - peptit ban đầu được phát triển bằng cách khuếch tán bề mặt tự do bằng cách sử dụng hệ thống kết tinh Topaz (Fluidigm, San Francisco). Các vi tinh thể được phát triển bằng cách khuếch tán hơi giọt treo sử dụng Fab nồng độ 7mg/ml trong cùng các điều kiện đệm Bis-tris propan 0,1M, amoni axetat 0,2M và PEG 10,000 18%. Các vi tinh thể sau đó được cải thiện bằng cách tạo mầm theo vệt trong natri format 0,15M và PEG 1500 15% để thu được các tinh thể nhỏ hình đĩa. Để thu số liệu, các tinh thể được chuyển vào dung dịch bảo vệ đông lạnh được chứa trong bình chứa được bổ sung 25% glyxerol. Sau đó, các tinh thể này được ghép lên một vòng nylon và đông lạnh nhanh trực tiếp trong nitơ lỏng.

Số liệu nhiễu xạ của tinh thể phức Fab-806 và Fab175-peptit thu được bằng cách sử dụng bộ phát hiện R-AXIS IV trên máy phát điện Rigaku micromax-007 được ghép với ống kính quang học AXCO, các số liệu này sau đó được xử lý bằng CrystalClear. Số liệu của phức Fab 806 -peptit được thu trên bộ phát hiện ADSC quantum315 CCD ở dòng chùm X29, Brookhaven National Laboratory, số liệu này được xử lý bằng HKL2000(Otwinowski, Z. và Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collection to inoscillation mode. Academic Press (New York)) (kết quả thống kê số liệu được nêu trong Bảng 9). Fab806 tự nhiên được phân tích bằng cách thay thế phân tử sử dụng chương trình MOLREP (Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) J. Appl. Cryst. 30, 1022-1025) sử dụng các tọa độ của cấu trúc Fab, việc xử lý tinh 2E8 của cấu trúc được tiến hành trong REFMAC5 (Murshudov et al. (1997) Acta crystallographica 53, 240-255) và xây dựng mô hình trong Coot (Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Acta crystallographica 60, 2126-2132).

Cả cấu trúc của phức Fab806-peptit lẫn Fab175-peptit đều được phân tích bằng cách cách thay thế phân tử sử dụng chương trình MOLREP với các tọa độ của cấu trúc của Fab806, việc hiệu chỉnh và xây dựng lại cấu trúc một lần nữa được tiến hành trong REFMAC5, và COOT và O. Việc khẳng định cấu trúc cuối cùng được tiến hành bằng PROCHECK (Laskowski et al. (1993) J. Appl. Cryst. 26, 283-291) và WHATCHECK (Hooft et al. (1996) Nature 381, 272).

Các nghiên cứu NMR

Đối với các nghiên cứu NMR, peptit được đánh đấu bằng ^{15}N được sản xuất bằng cách tái tổ hợp dưới dạng thể dung hợp với vùng SH2 của SHP2 bằng cách sử dụng phương pháp đã được Fairlie và các đồng tác giả mô tả trước đây. (Fairlie et al. (2002) Protein expression and purification 26, 171-178) ngoại trừ *E. coli* được sinh trưởng trong môi trường tối thiểu Neidhardt được bổ sung 15NH4Cl (Neidhardt et al. (1974) Journal of bacteriology 119, 736-747). Peptit này được phân cắt từ thành phần được dung hợp sử dụng CNBr, tinh chế bằng HPLC pha đảo và định dạng của nó được khẳng định bằng phổ khối MALDI-TOF và giải trình tự đầu N. Gốc methionin nằm trong trình tự liên kết với kháng thể 806 được gây đột biến với Leuxin cho phép cắt ra khỏi thành phần được dung hợp, nhưng không phản ứng với bản thân peptit này.

Các mẫu được sử dụng cho các nghiên cứu NMR được chuẩn bị trong dung dịch H_2O chứa ^2H_2O 5%, NaCl 70 mM và $NaPO_4$ 50 mM ở độ pH=6,8. Tất cả phổ được thu ở 298K trên phổ kế Bruker Avance500 bằng cách sử dụng đầu dò lạnh. Các chỉ số gán trình tự của peptit khi có mặt m806Fab được thiết lập bằng cách sử dụng 2D TOCSY và NOESY tiêu chuẩn cũng như phổ TOCSY và NOESY được chỉnh sửa bằng ^{15}N. Tương tác giữa peptit và fAb806 được xác định bằng cách theo dõi phổ ^{15}N HSQC của peptit trong điều kiên có hoặc không có fAb806. Sự nhiễu loạn của phổ ^{15}N HSQC của peptit khi có fAb806 rõ ràng cho thấy peptit này có khả năng liên kết đặc hiệu với fAb806 trong cùng điều kiện của dung dịch đó. Cấu hình chi tiết của peptit này ở dạng phức chất không được xác định. Độ lệch đối của giá trị độ dịch chuyển hóa học xoắn ngẫu nhiên cho mAb806 peptit được nêu trong Fig.93.

Phân bố sinh học của u chAb806 ở các bệnh nhân

Để chứng minh tính đặc hiệu u của mAb806 *in vivo,* phiên bản khảm (ch806) được lắp ghép và tạo ra trong các điều kiện GMP vòng (cGMP) (Panousis et al. (2005) Br. J. Cancer. 92, 1069-1077). Thử nghiệm trên người lần đầu pha I được tiến hành để đánh giá tính an toàn, sự phân bố sinh học và đáp ứng miễn dịch của ch806 ở các bệnh nhân có u dương tính với kháng thể 806, và kết quả về tính an toàn, sự phân bố sinh học và dược động học đã được thông báo trước đây (Scott et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 4071-4076). Để xác định tính đặc hiệu của ch806 trong u so với mô bình thường (nghĩa là, gan) ở các bệnh nhân, việc định lượng ch806 được u và gan hấp thu được tiến hành bằng cách tính toán tỷ lệ % liều dùng được tiêm (injected

dose - ID) của ^{111}In-ch806 từ các ảnh chụp toàn bộ cơ thể bằng máy ảnh tia gama một tuần sau khi tiêm ^{111}In-ch806 5-7mCi (200-280MBq). Các phép tính định liều ở gan và u được tiến hành trên các vùng quan tâm ở từng bệnh nhân. Bộ số liệu ảnh của thể dung hợp ^{111}In-ch806, được hiệu chỉnh theo nền và giảm dần, cho phép tính toán hoạt tính được tích lũy. Phép tính liều lượng được tiến hành để thu được hàm lượng của ^{111}In-ch806 ở u và gan một tuần sau khi tiêm.

b. Giải trình tự

VH và VL của mAb175 được giải trình tự, và các CDR được xác định, như sau:

VH của mAb175: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:128) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:129) được nêu trong Fig.74A và 74B, tương ứng. Các CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NOS:130, 131, và 132, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân trong Fig.74B.

VL của mAb175: trình tự axit nucleic (SEQ ID NO:133) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:134) được nêu trong Fig.75A và 75B, tương ứng. Các CDR1, CDR2, và CDR3 (SEQ ID NOS: 135, 136, và 137, tương ứng) được thể hiện bằng cách gạch chân trong Fig.75B.

Số liệu trình tự cho mAb175 dựa trên cả số liệu trình tự và số liệu về cấu trúc tinh thể, do dòng tế bào này không phải là dòng tế bào đơn dòng, và do đó, nhiều trình tự có thể thu được từ dòng tế bào này. Các trình tự của mAb175 nêu trên được khẳng định cấu trúc tinh thể, và khác nhau bởi một axit amin trong mỗi VL CDR1 và CDR2 so với các trình tự trước chỉ dựa trên số liệu về trình tự tiêu chuẩn. Isotyp khác của mAb175 (isotyp IgG2a bất thường) cũng thu được, dựa trên số liệu về trình tự cuối cùng và cấu trúc tinh thể.

c. Tính đặc hiệu của mAb175

Các nghiên cứu sơ bộ về liên kết cho thấy rằng mAb175 có tính đặc hiệu đối với EGFR tương tự như mAb806. Trong các vùng CDR của mAb806 (IgG2b) và mAb175 (IgG2a), các trình tự axit amin gần như giống nhau, chỉ khác nhau một axit amin ở mỗi trình tự. (Fig.65; Xem Ví dụ 26, dưới đây). Tất cả những khác biệt này nhằm bảo toàn điện tích và kích thước của các mạch nhánh. Rõ ràng là, các kháng thể này được phát triển một cách độc lập.

d. Các thử nghiệm

Một bộ gồm các thử nghiệm hóa mô miễn dịch được tiến hành để phân tích tính đặc hiệu của liên kết mAb175. mAb175 nhuộm màu các lát cắt u ghép khác loài A431 biểu hiện quá mức EGFR (Fig.66A) và các lát cắt u thần kinh đệm ghép khác loại U87MG.Δ2-7 biểu hiện Δ2-7EGFR (Fig.66A). Ngược lại, mAb175 không nhuộm màu các lát cắt u ghép khác loài U87MG. dòng tế bào U87MG chỉ biểu hiện EGFR kiểu dại ở mức bình thường (Fig.66A) và có vòng tự tiết không phát hiện thấy. Quan trọng nhất là, mAb175 không liên kết đặc hiệu với các lát cắt ở gan của người bình thường (Fig.66B). Do đó, mAb175 dường như có cùng tính đặc hiệu như mAb806, nghĩa là nó phát hiện được EGFR ở người được biểu hiện quá mức và bị cắt, nhưng không phát hiện thấy wtEGFR được biểu hiện ở mức bình thường.

Xác định epitop của mAb175

Do mAb175 cũng liên kết với Δ2-7EGFR, trong đó các axit amin 6-273 được loại bỏ, và $EGFR_{1-501}$, epitop của mAb175 phải nằm trong các gốc 274-501. Khi xác định epitop của mAb806, các tác giả sáng chế đã biểu hiện một bộ gồm nhiều mảnh EGFR được nối đuôi c-myc dung hợp với đầu carboxy của GH ở người, tất cả kết thúc ở axit amin 501 (Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539-550; Johns et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375-30384).

mAb175 cũng phản ứng với cả mảnh 274-501 EGFR lẫn 282-501 EGFR trong phân tích thẩm tách Western, nhưng không phát hiện các mảnh bắt đầu ở axit amin 290 hoặc 298 (Fig.73). Sự có mặt của tất cả các protein dung hợp GH-EGFR được khẳng định bằng cách sử dụng kháng thể c-myc, 9EI0 (Fig.73). Do đó, yếu tố quyết định của epitop của mAb175 nằm gần axit amin 290. Cuối cùng, mảnh 274-501 EGFR với epitop của mAb806 bị loại bỏ (Δ287-302) cũng cho kết quả âm tính với liên kết với mAb175 (Fig.73), điều này cho thấy rằng vùng này tương tự xác định hầu hết của liên kết mAb175.

Phương pháp thứ hai được sử dụng để phân tích đặc tính của epitop của mAb175. Các mảnh bao gồm các vùng ngoại bào của EGFR được biểu hiện trên bề mặt của nấm men và được thử nghiệm khả năng liên kết với mAb175 bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp sử dụng việc đếm dòng tế bào. mAb175 nhận biết mảnh 273-621 EGFR của nấm men, mảnh này tương ứng với vùng ngoại bào của Δ2-7 EGFR,

nhưng không tương ứng với các mảnh 1-176, 1-294, 294-543, hoặc 475-621 EGFR (Fig.67A và Fig.67B). Do đó, ít nhất là một phần của epitop của mAb175 phải nằm trong vùng nằm giữa các axit amin 274-294, phù hợp với số liệu thu được từ phép thẩm tách miễn dịch bằng cách sử dụng các mảnh EGFR. Do mAb175 liên kết với mảnh axit amin 273-621 (Fig.67C) bị biến tính nên epitop về bản chất phải thẳng (Fig.73). Rõ ràng là mAb806 và mAb175 nhận biết vùng vùng của nhau và có cấu hình tương tự của EGFR.

Sử dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore) để nghiên cứu liên kết của mAb175 với peptit EGFRt ($_{287}$CGADSYEMEEDGVRKC$_{302}$; SEQ ID NO:138)). EGFR$_{287-302}$ được cố định trên bề mặt cảm biến sinh học bằng cách sử dụng hóa chất trao đổi amin, thiol-disulfua hoặc kết hợp Pms-Ser. Phương pháp kết hợp Pms-Ser cố định peptit chỉ thông qua gốc xystein ở đầu N (Wade et al. (2006) Anal. Biochem. 348, 315-317).

mAb175 liên kết với EGFR$_{287-302}$ ở tất cả các hướng (Bảng 6). Ái lực của mAb175 đối với EGFR$_{287-302}$ nằm trong khoảng từ 35 nM khi sử dụng hóa chất kết hợp Pms-Serin so với 154 nM khi sử dụng hóa chất kết hợp amin. Trong tất cả trường hợp, ái lực liên kết của mAb175 đối với EGFR$_{287-302}$ thấp hơn ái lực liên kết thu được của mAb806 (Bảng 6). Các tác giả sáng chế cũng xác định được ái lực của mAb175 với hai mảnh ngoại bào khác nhau của EGFR. mAb175 liên kết với mảnh 1-501 với ái lực tương tự như ái lực thu được khi sử dụng peptit (16 nM so với 35 nM) (Bảng 6). Như mong đợi, ái lực của mAb175 đối với vùng ngoại bào 1-621 có chiều dài đầy đủ, mà có thể tạo thành cấu hình xoắn thấp hơn nhiều (188 nM). Mặc dù mAb806 và mAb 175 có ái lực tương tự nhau đối với EGFR$_{287-302}$, nhưng dường như mAb175 có ái lực cao hơn đối với vùng ngoại bào của EGFR (Bảng 6). Rõ ràng là, epitop của mAb175 nằm trong EGFR$_{287-302}$ và, tương tự như mAb806, liên kết ái lực đối với vùng ngoại bào của EGFR phụ thuộc vào cấu hình.

Bảng 6

Xác định ái lực liên kết kháng thể của mAb806 và mAb175 đối với epitop của các EGFR bằng BIAcore

Mảnh EGFR	K_D của mAb175 (nM)	K_D của mAb806 (nM)
287-302 (Kết hợp Pms-Ser)	35	16

287-302 (Kết hợp thiol)	143	84
287-302 (Kết hợp)	154	85
1-501 (Không có khả năng tạo xoắn)	16	34
1-621 (Có khả năng tạo xoắn)	188	389

Bảng gồm các thể đột biến của mảnh 273-621 EGFR, được biểu hiện trên bề mặt của nấm men (Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539-550; Johns et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375-30384) được sử dụng để phân tích đặc tính cấu trúc của epitop của mAb175. mAb 175 và mAb806 có mô hình hoạt động với các thể đột biến gần giống nhau (Bảng 7). Việc phá vỡ liên kết disulfua 287-302 chỉ có tác dụng vừa phải đến hoạt tính của epitop do kháng thể này liên kết với tất cả các đột biến ở C287 và một số, nhưng không phải tất cả, đột biến ở C302 (Bảng 7). Các axit amin có vai trò thiết yếu trong việc liên kết của mAb175, bao gồm E293, G298, V299, R300 và C302 (Bảng 7). mAb175 khi xuất hiện ở mức độ vừa phải thì nhạy hơn so với các đột biến V299 và D297, nhưng mAb806 cũng thể hiện khả năng liên kết giảm với một số đột biến ở các vị trí này (Bảng 7). Một lần nữa, epitop của mAb175 dường như cần thiết như epitop được nhận biết bởi mAb806.

Bảng 7

Thể hiện các đột biến của Epitop EGFR 287-302 trên nấm men và tỷ số liên kết đối với mAb806 và mAb175

Đột biến EGFR	Liên kết đối với mAb806	Liên kết đối với mAb175
C287A	+	+
C287G	+	+
C287R	+	+
C287S	+	+
C287W	+	+
C287Y	+	+
G288A	++	++
A289K	++	++
D290A	++	++
S291A	++	++
Y292A	++	++
E293A	+	+

Đột biến EGFR	Liên kết đối với mAb806	Liên kết đối với mAb175
E293D	+	+
E293G	+	+
E293K	-	-
M294A	++	++
E295A	++	++
E296A	++	++
D297A	++	+ tiếp xúc
D297Y	+	+
G298A	+	+
G298D	-	-
G298S	-	-
V299A	++	+ tiếp xúc
V299D	-	-
V299K	++	+ tiếp xúc
R300A	++	++
R300C	+	+
R300P	-	-
K301A	++	++
K301E	+	+
C302A	-	-
C302F	+	+
C302G	-	-
C302R	+	+
C302S	-	-
C302Y	+	+

Hiệu lực của mAb175 đối với các u ghép khác loài được kích thích bằng Δ2-7EGFR hoặc vòng tự tiết EGFR

Hoạt tính kháng u *in vivo* của mAb806 và mAb175 đối với u thần kinh đệm ghép khác loại U87MG.Δ2-7 được xác định. Các u ghép khác loài này được phép thiết lập trong 6 ngày trước khi bắt đầu điều trị bằng liệu pháp kháng thể (3 lần một tuần trong 2 tuần vào các ngày đã chỉ định). Vào thời điểm này, thể tích trung bình của u là 100 mm^3 (Fig.68A). Việc điều trị bằng mAb175 cho kết quả là làm giảm tốc độ phát triển của u toàn bộ so với điều trị bằng tá dược hoặc mAb806 và cho kết quả cao đáng kể

vào ngày thứ 19 sau khi chủng (P < 0,0001 so với đối chứng và P <0,002 so với mAb806), khi đối tượng thử nghiệm ở nhóm đối chứng bị giết theo quy định. Thể tích trung bình của u vào thời điểm này là 1530, 300 và 100 mm^3 đối với nhóm được điều trị bằng tá dược, mAb806 và mAb175, tương ứng (Fig.68A), điều này khẳng định hoạt tính kháng u của mAb175 đối với các u ghép khác loài biểu hiện Δ2-7 EGFR.

Mặc dù các tế bào U87MG biểu hiện khoảng 1×10^5 EGFR/tế bào, nhưng mAb806 không có khả năng nhận biết EGFR bất kỳ trong số EGFR trên bề mặt, và không ngạc nhiên khi nó không ức chế sự phát triển của tế bào U87MG *in vivo*. Ngoài ra, các tế bào không cùng biểu hiện phối tử EGFR bất kỳ. Một nghiên cứu đã được tiến hành để xác định xem liệu epitop của EGFR có bị lộ diện tạm thời hay không, và khi đó, nó có khả năng được nhận biết bởi mAb806 và mAb175 trong các tế bào chứa vòng tự tiết EGFR hay không. Dòng tế bào tuyến tiền liệt DU145 biểu hiện wtEGFR ở mức tương tự với mức quan sát được ở các tế bào U87MG, tuy nhiên không giống như các tế bào U87MG, các tế bào DU145 có sự khuếch đại của gen TGF-α và do đó, chúng biểu hiện vòng tự tiết EGFR/TGF-α. Cả mAb175 và mAb 806 đều liên kết đặc hiệu với các tế bào DU145 như được xác định bằng phép phân tích FACS (Fig.68B) và cả hai kháng thể này đều có khả năng kết tủa miễn dịch một tỷ lệ nhỏ EGFR được chiết ra khỏi các tế bào này (Fig.68C). Cả hai kỹ thuật này thể hiện liên kết lớn hơn của mAbl75, tuy nhiên, khi so với mAb528, mà liên kết với vùng L2, mAb175 và mAb806 chỉ liên kết với tiểu phần của EGFR trên bề mặt của những tế bào này (Fig.68B và Fig.68C). Kết quả quan sát tương tự như với dòng tế bào tuyến tiền liệt thứ hai (LnCap); (số liệu không được thể hiện) và dòng tế bào ruột (LIM1215), cả hai dòng tế bào này cũng chứa vòng tự tiết EGFR (Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) Mol Cell Biol. 3, 1235-1243; Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) Mol Cell Biol. 11, 4005-4014). Rõ ràng là, mAb806 và mAb175 có thể chỉ nhận biết một phần nhỏ EGFR trên các tế bào khi có mặt vòng kích thích tự tiết.

Do mAb175 và mAb806 liên kết hiệu quả hơn với EGFR được biểu hiện trong các tế bào DU145 so với các tế bào U87MG, nên một nghiên cứu đã được tiến hành để phân tích hoạt tính kháng u của các kháng thể này trong các u ghép khác loài DU145 được phát triển ở chuột nhắt trụi lông. Các u ghép khác loài được phép thiết lập trong 18 ngày trước khi bắt đầu điều trị bằng liệu pháp kháng thể (3 lần một tuần trong 2 tuần vào các ngày đã chỉ định). Vào thời điểm này, thể tích trung bình của u là 90 mm^3

(Fig.68D). Cả mAb175 lẫn mAb806 đều ức chế sự phát triển của các u ghép khác loài DU145. Đối tượng thử nghiệm ở nhóm đối chứng bị giết vào ngày thứ 67 và có thể tích trung bình của u đạt 1145 mm^3 so với 605 và 815 mm^3 đối với nhóm được điều trị bằng mAb806 và mAb175, tương ứng ($p < 0,007$ và 0,02 tương ứng) (Fig.68D).

Cấu trúc 3D của $EGFR_{287-302}$ khi tiếp xúc với các mảnh Fab của mAb806 và mAb175

Để hiểu chi tiết ở cấp độ phân tử cách mAb806 và mAb175 nhận biết EGFR ở một số, nhưng không phải là tất cả các cấu hình, cấu trúc tinh thể của các mảnh Fab đối với cả kháng thể nêu trên được xác định ở dạng phức với epitop của $EGFR_{287-302}$ bị oxy hóa (ở độ phân giải 2,0 và 1,59 Å tương ứng, Fig.69A & 69B) và đơn lẻ (ở độ phân giải 2,3 Å và 2,8 Å, tương ứng). Trong cả hai trường hợp, cấu trúc Fab tự do và ở dạng phức chất về cơ bản là giống nhau và các cấu hình của peptit và vòng CDR của các kháng thể này được xác định rõ (Fig.69). Epitop có cấu trúc dải β, với một đầu của dải này hướng về Fab và V299 bị vùi ở tâm của vị trí liên kết kháng nguyên (Fig.69C-E). Cả hai đầu của epitop đều tiếp xúc với dung môi, phù hợp với các kháng thể này liên kết với các polypeptit dài hơn.

Một trong số các gốc của kháng thể 20 tiếp xúc với epitop, chỉ có hai thay thế giữa mAb806 và mAb175 (Fig.65). Các gốc tiếp xúc của mAb175 là: S30, S31, N32, Y49, H50, Y91, F94, W96 trong chuỗi nặng và D32, Y33, A34, Y51, S53, Y54, S55, N57, R59, A99, G100, R101 trong chuỗi nhẹ; Các gốc tiếp xúc của mAb 806 là giống nhau với các khác biệt về trình tự đối với chuỗi nhẹ, N30 và chuỗi nặng, F33. $EGFR_{287-302}$ liên kết với Fab thông qua sự tiếp xúc chặt chẽ giữa các gốc 293-302 của peptit, với hầu hết các điểm tiếp xúc nằm giữa các gốc 297 và 302. Chỉ có liên kết hydro giữa các nguyên tử của mạch chính của $EGFR_{287-302}$ và Fab đối với các gốc 300 và 302 (Fig.69F). Việc nhận biết trình tự của epitop xảy ra thông qua liên kết hydro của mạch nhánh với các gốc E293 (với H50 và R101 của Fab), D297 (với Y51 và N57), R300 (với D32) và K301 (thông qua các phân tử với Y51 và W96). Tương tác kỵ nước được tạo ra ở G298, V299 và C302.

Cấu hình của khung epitop nằm giữa 293 và 302 về cơ bản gần giống với tinh thể Fab806 và Fabl75 (độ lệch rms = 0,4 Å, đối với các nguyên tử Cα trong các gốc này). Mặc dù bị ràng buộc bởi liên kết disulfua, nhưng đầu N của peptit này (287-292) tiếp xúc không đáng kể trong cấu trúc của kháng thể và các cấu hình của vùng này khác

nhau. Tuy nhiên, đoạn này trong phức Fab806 xuất hiện khá lộn xộn. Điều đáng quan tâm hơn là cấu hình của peptit $EGFR_{287-302}$ khi tiếp xúc với các kháng thể khá giống với cấu hình của $EGFR_{287-302}$ quan sát được trong khung của các cấu trúc EGFR được nối với nhau hoặc không được nối với nhau (Li et al., 2005; Garrett et al., 2002). Đối với $EGFR_{287-302}$ trong phức Fabl75, độ lệch rms trong vị trí Cα lần lượt là 0,66 và 0,75 Å (Fig.69).

Để hiểu thêm về việc nhận biết EGFR bởi mAb806 và mAb175, cấu hình của peptit $EGFR_{287-302}$ được oxy hóa đánh dấu bằng ^{15}N được nghiên cứu bằng phổ trong dung dịch khi không có mặt Fab 806 và khi có mặt Fab 806 (xem phần Vật liệu và phương pháp). Đối với trường hợp peptit tự do, phổ cộng hưởng được gán cố định và so sánh với phổ cộng hưởng ghi được đối với trường hợp cuộn ngẫu nhiên. Về cơ bản, peptit tự do có cấu trúc cuộn ngẫu nhiên không cho dải beta như quan sát thấy ở EGFR tự nhiên (Garrett et al. (2002) Cell 20;110, 763-773).

Khi bổ sung Fab, quan sát thấy các độ chuyển dịch trong phổ cộng hưởng. Tuy nhiên, do tín hiệu yếu thu được từ việc mở rộng vạch đáng kể khi bổ sung Fab và sự kết tinh hoàn toàn của các phức chất nên cấu trúc dung dịch của phức Fab860-epitop không được phân tích thêm. Rõ ràng là, khi peptit liên kết với mảnh Fab của mAb806 (hoặc mAb175 thì dường như Fab lựa chọn hoặc tạo ra cấu hình cho peptit tương ứng với peptit đó trong thụ thể tự nhiên.

Để nghiên cứu tại sao mAb806 và mAb175 chỉ nhận biết một vài cấu hình của EGFR, mảnh Fab của mAb175 được cắt ngắn ở vùng ngoại bào của EGFR (các monome nối với nhau hoặc không nối với nhau) bằng cách chồng lên $EGFR_{287-302}$. Đối với mảnh giống như Δ2-7 thì không có xung đột đáng kể về mặt không gian với thụ thể. Ở dạng không nối với nhau, xuất hiện một khu vực bề mặt gần như dễ dàng tiếp cận hơn của Fab bị che lấp (920 $Å^2$ so với 550 $Å^2$ ở dạng không được nối). Do đó, kháng nguyên này có thể tạo ra các vùng tiếp xúc khác với các vùng không phải là CDR của kháng thể này, như được thể hiện bởi các đột biến biểu hiện của nấm men (Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539-550). Ngược lại, việc cắt ngắn vùng ngoại bào của toàn bộ EGFR trên Fab sẽ tạo ra việc gần chồng lấn không gan hoàn toàn với một phần của epitop trước vùng CR1 (các gốc 187-286) và đi qua tâm của Fab (Fig.69D và 69E). Do đó, do vùng CR1 có cấu trúc gần như giống với các cấu hình ở dạng được nối hoặc không được nối nên mAb806 hoặc mAb175 sẽ không có khả năng

liên kết đặc hiệu với cả hai dạng của EGFR. Rõ ràng là, phải có sự khác nhau về hướng của epitop liên quan đến vùng CR1 trong cả hai cấu hình đã biết của wtEGFR và hướng cho phép epitop liên kết. Xem xét kỹ vùng CR1 cho thấy liên kết disulfua (271-283) $EGFR_{287-302}$ trước đó buộc polypeptit này ngăn cản sự tiếp cận vào epitop; phá vỡ liên kết disulfua này, ngay cả khi nó không liên quan đến việc liên kết trực tiếp với các kháng thể, điều này được mong đợi là cho phép vùng CR1 không gấp nếp một phần để mAb175 hoặc mAb806 có thể lại tiếp cận được với epitop.

Phá vỡ liên kết của disulfua của EGFR 271-283 làm tăng khả năng liên kết của mAb806

Các liên kết disulfua trong protein làm cấu trúc cứng nhắc, nhưng ở một số thụ thể trên bề mặt tế bào, cụ thể là các thụ thể của xytokin và yếu tố sinh trưởng thì việc phá vỡ liên kết và thay đổi liên kết disulfua có thể kiểm soát được chức năng của thụ thể (Hogg, P. J. (2003) Trends in biochemical sciences 28, 210-214). Do đây là một cơ chế mà nhờ đó mAb806 và mAb175 có thể lại tiếp cận được với vị trí liên kết nên việc làm tăng khả năng tiếp cận của epitop được nỗ lực thực hiện bằng cách gây đột biết ở một trong hai hoặc cả hai gốc xystein ở vị trí 271 và 283 so với các gốc alanin (C271A/C283A). Các vectơ có khả năng biểu hiện C271A-, C283A- hoặc C271A/C283A-EGFR có chiều dài đầy đủ được chuyển nhiễm vào trong dòng tế bào Ba/F3 phụ thuộc IL-3. Các dòng Ba/F3 thích hợp, biểu hiện đột biến C271A- và C271A/C283A-EGFR ở các mức tương đương với wtEGFR được chọn (Fig.70A. các tế bào Ba/F3 biểu hiện đột biến C283A-EGFR mức cao không được quan sát. Như đã mô tả ở trên, wtEGFR phản ứng kém với mAb806; tuy nhiên, các thụ thể đột biến phản ứng mạnh như nhau đối với mAb528, mAb806 và kháng thể kháng FLAG, điều này cho thấy rằng thụ thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào, gấp nếp hợp lý và epitop cho mAb806 có hoàn toàn khả năng tiếp cận trong trường hợp này. Để khẳng định rằng mAb806 nhận biết đột biến C271A/C283A hiệu quả hơn so với wtEGFR, tỷ lệ của liên kết của mAb806 với liên kết của mAb528 được xác định. Do cả EGFR kiểu dại và C271A/C283A EGFR đều được gắn đuôi FLAG ở đầu N nên tỷ lệ liên kết của mAb806 và liên kết của mAb528 với kháng thể M2 cũng được xác định. Như đã thông báo ở trên, mAb806 chỉ nhận biết một phần nhỏ trong số tổng wtEGFR được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào Ba/F3 (tỷ lệ liên kết của mAb806/528 là 0,08) (Bảng 8).

Ngược lại, mAb806 nhận biết gần như tất cả đột biến C271A/C283A EGFR được biểu hiện trên bề mặt tế bào (tỷ lệ liên kết của mAb806/528 là 1,01) (Fig.70A và Bảng 8).

Bảng 8

Khả năng phản ứng của mAb806 với các tế bào biểu hiện EGFR kiểu dại hoặc C271A/C283A EGFR

	Tỷ lệ liên kết của kháng thể		
Dòng tế bào	mAb528/M2	mAb806/M2	mAb806/mAb 528
wtEGFR-FLAG	1,37	0,11	0,08
wt-EGFR	-	-	0,07
C271/283*	1,08 ± 0,10	1,09 ± 0,38	1,01 ± 0,13

*tính trung bình cho bốn dòng độc lập

Sự đột biến của hai xystein không ảnh hưởng đến liên kết của EGF hoặc chức năng của thụ thể. Các tế bào BaF3 biểu hiện đột biến C271A/C283A EGFR tăng sinh khi có mặt EGF (Fig.70B). Sự dịch chuyển sang trái của đường cong đáp ứng liều dùng đối với EGF ở tế bào biểu hiện các đột biến C271A/C283A được quan sát thấy ổn định, điều này cho thấy cả hai đều có ái lực cao hơn đối với phối tử, hoặc việc truyền tín hiệu được tăng cường có khả năng đối với thụ thể đột biến. Phân tích thẩm tách Western khẳng định rằng đột biến C271A/C283A được biểu hiện ở các mức tương tự với wtEGFR và là tyrosin được phosphoryl hóa đáp ứng với việc kích thích EGF (Fig.70C). Phù hợp với các nghiên cứu trước đây ở các dòng tế bào khác, mAb806 không ảnh hưởng đến sự tăng sinh *in vitro* do EGF gây ra đối với các tế bào Ba/F3 biểu hiện wtEGFR, trong khi đó phối tử phong bế mAb528 lại ức chế hoàn toàn sự tăng sinh do EGF gây ra đối với các tế bào này (Fig.70D, bảng bên trái). Ngược lại, mAb806 loại bỏ hoàn toàn sự tăng sinh do EGF gây ra ở các tế bào BaF3 biểu hiện đột biến C271A/C283A (Fig.70D, bảng bên phải). Khi vòng 271-283 xystein bị phá vỡ, không chỉ có mAb806 liên kết một cách hiệu quả hơn mà ngay sau khi liên kết mAb806 ngăn cản sự tăng sinh do phối tử gây ra.

Bảng 9

Thu thập số liệu và hiệu chỉnh thống kê

Thu thập số liệu

	806 (tự nhiên)	806 (peptit)	175 (tự nhiên)	175 (peptit)
Kích thước nhóm không gian của tế bào (Å)	$P2_12_12$	$P2_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12$

a	140,37	35,92	36,37	83,17
b	74,62	83,16	94,80	69.26
c	83,87	72,21 β=92,43	108,90	71,47
Nguồn	sáng chế	BNL X29	sáng chế	sáng chế
Chiều dài sóng (Å)	1,542	1,1	1,542	1,542
Khoảng phân giải (Å)	29,7-2,2 (2,27-2,20)	50-2,0 (2,07-2,0)	50-2,8 (2,87-2,8)	14,18-1,59 (1,65-1,59)
R_{merge} (%)	6,4 (26,7)	6,6 (28,2)		8,6 (30,0)
I/σI	12,2 (3,2)	22 (3,15)		10,2 (2,2)
Tính hoàn chỉnh (%)	98,3 (91,3)	96,6 (79.2)	98,4 (90,5)	78,8 (11,8) 98,1 ở 1,89 Å
Tổng các phản xạ	156497	98374		205401
Các phản xạ đặc trưng	44905	27692	9171	43879

Hiệu chỉnh

Khoảng phân giải (Å)	20-2,3	72,17-2,00	50-2,6	14,18-1,6
Các phản xạ	37397	26284	9171	41611
$R_{tinh\ thể}$	0,225	0,226	0,210	0,203
$R_{tự\ do}$	0,289	0,279	0,305	0,257
Các nguyên tử của protein	6580	3294	3276	3390
Các nguyên tử dung môi	208	199	46	247
Chiều dài liên kết r.m.s.d (Å)	0,022	0,007	0,015	0,014
Chiều dài liên kết r.m.s.d (°)	1,70	1,12	1,77	1,48
Hệ số B trung bình ($Å^2$)	40,3	33,6	37,5	20,7
Tổng các yếu tố dị hướng B ($Å^2$) B11	-1,52	2,42	0,20	1,13

Thảo luận

Các nghiên cứu cấu trúc với $EGFR_{287-302}$ epitop thể hiện rằng mAb806 và mAb175 đều nhận biết cùng một motif có cấu trúc 3D trong cấu trúc wtEGFR, điều này cho thấy cấu hình khung cũng xuất hiện trong và lộ diện trong Δ2-7EGFR. Tuy nhiên, quan trọng là hướng của epitop trong các cấu trúc này sẽ ngăn cản kháng thể tiếp cận các axit amin liên quan. Điều này phù hợp với các quan sát được trong thử nghiệm rằng mAb806 không liên kết với wtEGFR được biểu hiện trên bề mặt tế bào ở mức có tác dụng sinh lý (mức sinh lý).

Kết quả với đột biến $EGFR_{C271A/C283A}$ thể hiện rằng vùng CR1 có thể mở rộng để mAb806 và mAb175 có thể liên kết theo tỷ lượng hóa học với thụ thể đột biến này. Thụ thể đột biến này có thể vẫn thu nhận cấu hình tự nhiên vì nó hoàn toàn đáp ứng với sự kích thích EGF nhưng không giống như wtEGFR, bị mAb806 ức chế hoàn toàn. Dạng gấp nếp sai của EGFR với liên kết disulfua bị phá vỡ là để tồn tại trên bề mặt của các tế bào ung thư, số liệu cho thấy rõ ràng rằng nó sẽ có khả năng khởi động quá trình truyền tín hiệu trong tế bào và nên bị mAb806 hoặc mAb175 ức chế.

Cách giải thích khác cho số liệu nêu trên là trong quá trình hoạt hóa phối tử việc tái cấu trúc thụ thể có thể dẫn đến việc không gấp nếp cục bộ trong vùng lân cận của epitop, việc này cho phép thụ thể thu nhận cấu hình cho phép liên kết. Trong các cấu trúc tinh thể, epitop nằm gần tâm vật lý của vùng ngoại bào của EGFR và việc tiếp cận với epitop sẽ bị phong bế bởi cả vùng CR1 bị gấp nếp lẫn cấu trúc bậc bốn của vùng ngoại bào của EGFR. Ở cấu hình không được nối và cấu hình được nối, tính thu nhận của vùng CR1 được làm ổn định bằng các tương tác khác với các miền L1:phối tử:L2 (dạng không được nối) hoặc các miền L2:CR2 (dạng được nối). Tuy nhiên, vùng epitop có một số thông số nhiệt cao nhất được phát hiện thấy trong vùng ngoại bào: epitop của mAb806/175 có cấu trúc không bền. Trong quá trình hoạt hóa thụ thể, khi thụ thể chuyển trạng thái giữa cấu hình được nối và không được nối, mAb806 và mAb175 có thể tiếp cận epitop. Do đó, ở cấp độ phân tử, các cơ chế này có thể góp phần vào việc liên kết không đáng kể của mAb806 và mAb175 với các tế bào bình thường và ở cấp độ gần như cao hơn đó là liên kết với các tế bào u biểu hiện EGFR quá mức và/hoặc ở dạng đã hoạt hóa.

Ví dụ 24. Các kháng thể đơn dòng 124 và 1133

Như được đề cập trong Ví dụ 1 ở trên, mAb124 và mAb1133 được tạo ra vào cùng thời điểm như với mAb806 và được phát hiện thấy là biểu hiện các đặc tính tương tự, cụ thể là tính đặc hiệu đối với EGFR kiểu dại được biểu hiện quá mức, với các đặc tính đặc trưng của mAb806 được đề cập ở đây.

Tiến hành các sàng lọc sơ bộ ở New York (Jungbluth et al. (2003) A Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over-Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor *PNAS*. 100, 639-644). Tiến hành đánh giá tính cạnh tranh bằng thử nghiệm ELISA (thử nghiệm ELISA cạnh tranh) và phân tích

Biacore để xác định khả năng nhận biết của mAb124 và/hoặc mAb1133 đối với epitop giống với mAb806 hoặc yếu tố quyết định EGFR thay đổi.

Phân tích FACS

Liên kết của kháng thể với các tế bào U87MG.Δ2-7, A431 và HN5 được đánh giá bằng phép phân tích FACS. Tất cả các kháng thể đều thể hiện tính đặc hiệu tương tự như tính đặc hiệu của mAb806 với khả năng liên kết mạnh với d2-7 EGFR và liên kết yếu với EGFR kiểu dại được biểu hiện quá mức.

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh

Một loạt thử nghiệm ELISA cạnh tranh được tiến hành để xác định xem liệu kháng thể 124 và kháng thể 1133 có cạnh tranh liên kết với epitop của mAb806 hay không. Tóm tắt như sau, vùng tan bị biến tính của EGFR (sEGFR) được phủ lên các đĩa ELISA. Kháng thể 124 hoặc kháng thể 1133 không đánh dấu sau đó được bổ sung vào đĩa với nồng độ tăng dần. Sau khi rửa, mAb806 được biotin hóa được bổ sung vào mỗi giếng để xác định khả năng liên kết với sEGFR. Việc phát hiệu mAb806 ở dạng liên kết được tiến hành bằng cách sử dụng - HRP dung hợp với streptavidin. Nếu kháng thể liên kết với cùng epitop (hoặc các epitop chồng lấn) của mAb806 thì liên kết của mAb806 là không được mong đợi.

Kết quả được tổng hợp trong Bảng 10. Ảnh hưởng liên kết ức chế phụ thuộc vào nồng độ được quan sát đối với mAb124 và liên kết mAb1133:mAb806 tăng lên khi nồng độ kháng thể không được đánh dấu giảm, điều này cho thấy rằng kháng thể 124 và kháng thể 1133 nhận biết epitop giống như mAb806 hoặc eptiop trong vùng lân cận.

Bảng 10

Tổng hợp kết quả của thử nghiệm ELISA cạnh tranh về liên kết của mAb124 và mAb1133 với sEGFR.

Kháng thể phong bế không được đánh dấu	Liên kết của kháng thể 806 được đánh dấu bằng biotin
124	Không
1133	Không
806 (đối chứng cho ức chế)	Không
IgG2b không liên quan	++++

Phân tích FACS: Tính cạnh tranh liên kết với tế bào

Các tế bào U87MG.Δ2-7 được ủ trước với kháng thể 124, 1133 không được đánh dấu. Đối chứng dương, kháng thể 806 và đối chứng cùng lớp cũng được sử dụng trong thử nghiệm. Các tế bào được rửa, sau đó được nhuộm màu bằng mAb806 và cho dung hợp với Alexa488 với mức độ liên kết của kháng thể 806 được xác định bằng phân tích bằng FACS.

Kết quả được tổng hợp trong Bảng 11. Kháng thể 124 và kháng thể 1133 phong bế liên kết của mAb806 với bề mặt tế bào, điều này cho thấy hai kháng thể này nhận biết epitop giống như mAb806 hoặc một epitop trong vùng lân cận.

Bảng 11

Phép phân tích FACS: Tính cạnh tranh liên kết với tế bào U87MG.Δ2-7

Kháng thể phong bế không được đánh dấu	Ức chế kháng thể 806 được đánh dấu bằng Alexa488
124	+++
1133	+++
806	++++
Đối chứng IgG2b	không

Phân tích BIAcore: Liên kết với epitop peptit của mAb806

Trình tự axit amin của EGFR, $_{287}$CGADSYEMEEDGVRKC$_{302}$ (SEQ ID NO:14) chứa epitop của mAb806 được tổng hợp dưới dạng peptit và được cố định trên chip cảm biến sinh học. Liên kết của các kháng thể 124, 1133 và 806 (200nM) với peptit này được xác định. RU liên kết lớn nhất thu được được tổng hợp trong Bảng 12. Kháng thể 124, 1133 thể hiện khả năng liên kết mạnh với peptit chứng tỏ rằng hai kháng thể này cũng nhận biết epitop peptit của kháng thể 806.

Bảng 12

Phân tích BIAcore: Liên kết lớn nhất với epitop peptit của mAb806

Kháng thể	Liên kết với epitop peptit của mAb806 (RU)
806	1100
124	1000
1133	800

Thảo luận

Như được đề cập trong Ví dụ này, mAb124 và mAb1133 liên kết đặc hiệu với epitop peptit của EGFR được nhận biết bởi mAb806 và phong bế liên kết của mAb806

với vùng ngoại bào của EGFR và các tế bào biểu hiện d2-7 EGFR. Do đó, cả ba kháng thể này đều nhận biết cùng một yếu tố xác định trên EGFR.

Ví dụ 25. Thử nghiệm lâm sàng đối với ch806

Nghiên cứu lâm sàng được thiết kế để xác định tính đặc hiệu *in vivo* của ch806 trong phân tích tạo đích u/phân bố sinh học/dược động học ở các bệnh nhân mang nhiều loại u.

1. Vật liệu và phương pháp

Mẫu thử nghiệm

Thử nghiệm trên người này là thử nghiệm đánh dấu mở, liều dùng tăng dần Pha I. Mục đích thứ nhất là để đánh giá tính an toàn của việc truyền liều dùng đơn ch806 cho các bệnh nhân mang u tiến triển biểu hiện kháng nguyên 806. Mục đích thứ hai của thử nghiệm này là để xác định sự phân bố sinh học, dược động học và mức độ dung nạp ^{111}In-ch806 của u; xác định đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân với ch806; và đánh giá biểu hiện sớm của hoạt tính lâm sàng của ch806. Liều dùng đơn được chọn cho thử nghiệm này để đánh giá tối ưu tính đặc hiệu *in vivo* của ch806 đối với EGFR được biểu hiện trên u. Quy trình thử nghiệm đã được Human Research and Ethics Commitee của bệnh viện Austin chấp thuận trước khi bắt đầu thử nghiệm. Thử nghiệm được tiến hành theo phác đồ Australian Therapeutic Goods Administration Clinical Trials Exemption (CTX). Toàn bộ số bệnh nhân đều được ký vào biên bản chấp nhận tham gia thử nghiệm.

Tiêu chuẩn đánh giá sự thích hợp bao gồm: u tiến triển hoặc u di căn dương tính với sự biểu hiện kháng nguyên 806 (biểu hiện kháng nguyên 806) dựa trên việc lai tại chỗ tạo màu hoặc phân tích hóa mô các mẫu u thu được (các khối u được xác định là dương tính với kháng nguyên 806 nếu đánh giá hóa mô miễn dịch các mẫu u thu được cho thấy không có tế bào bất kỳ dương tính với sự biểu hiện kháng nguyên 806, xem bên dưới); u ác tính được chứng minh bằng mô học hoặc tế bào học; bệnh có thể xác định được bằng cách chụp cắt lớp (chụp CT) với ít nhất một thương tổn $\geq$ 2 cm; thời gian sống sót mong đợi ít nhất là 3 tháng; thang điểm Karnofsky (KPS) $\geq$ 70; chức năng huyết học, gan và thận thích hợp; tuổi > 18 tuổi; và có khả năng chấp nhận như được thông báo. Đối tượng loại trừ bao gồm: hoạt hóa di căn vào hệ thần kinh trung ương (trừ khi được điều trị đúng và thích hợp); đã áp dụng liệu pháp hóa học, liệu

pháp miễn dịch, liệu pháp sinh học, hoặc liệu pháp phóng xạ trong khoảng bốn tuần trước khi bắt đầu nghiên cứu; được tiếp xúc trước đó với kháng thể (trừ khi không có bằng chứng cho thấy sự có mặt của kháng thể kháng khảm ở người (HACA)); không khôi phục hoàn toàn các tác dụng của liệu pháp điều trị ung thư trước đó; dùng đồng thời các corticosteroit toàn thân hoặc các chất ức chế miễn dịch; tình trạng nhiễm khuẩn/virut không kiểm soát hoặc các bệnh trầm trọng khác; mang thai hoặc đang cho con bú; phụ nữ có khả năng mang thai không sử dụng các biện pháp tránh thai có thể được chấp nhận trong y tế.

Các bệnh nhân được truyền liều dùng đơn ch806 được đánh dấu bằng Indin-111 (^{111}In, 200-280 MBq; 5-7 mCi) bằng cách truyền vào tĩnh mạch trong nước muối thông thường chứa 5% albumin huyết thanh của người trong thời gian 60 phút. Liệu pháp tăng liều lượng theo kế hoạch có nghĩa bệnh nhân được nhận một trong số bốn mức liều dùng: 5, 10, 20 và 40 mg/m^2. Các liều dùng này được chọn để đánh giá tính đặc hiệu liên kết của ch806 với EGFR được biểu hiện trên u, và để xác định nếu mô bình thường bất kỳ liên kết với ch806 (và ảnh hưởng đến dược động học hoặc phân bố sinh học) *in-vivo*. Phân bố sinh học, dược động học, và đáp ứng miễn dịch được đánh giá cho từng bệnh nhân.

Việc chụp ảnh bằng tia gama toàn bộ cơ thể để đánh giá phân bố sinh học và mức dung nạp ch806 của u được tiến hành vào các ngày 0, ngày 1, ngày 2 hoặc 3, ngày 4 hoặc 5, và ngày 6 hoặc 7 sau khi truyền ^{111}In-ch806. Các mẫu máu dùng để phân tích dược động học được lấy vào tại các thời điểm trên và lấy thêm vào ngày 14 (± 2 ngày) và ngày 21 (± 2 ngày). Các mẫu máu được đánh giá mức HACA được lấy vào thời điểm ban đầu, và hằng tuần cho đến ngày 30. Việc đánh giá độc tính được tiến hành vào mỗi lần kiểm tra thử nghiệm. Việc đánh giá sinh lý và gan học và sinh hóa thông thường được tiến hành hằng tuần cho đến khi kết thúc nghiên cứu (ngày 30). Việc đánh giá lại được tiến hành vào ngày 30.

Tiêu chuẩn tăng liều dùng

Bệnh nhân đầu tiên được dùng từng mức liều dùng và theo dõi trong bốn tuần trước khi tiến hành thử nghiệm đối với các bệnh nhân bất kỳ khác. Nếu không thấy độc tính giới hạn theo liều dùng (DLT) ở một trong hai bệnh nhân đầu tiên trong bốn tuần sau khi truyền ch8063, thì bốn bệnh nhân tiếp theo sẽ được dùng với mức liều

dùng cao nhất. Nếu một bệnh nhân trong nhóm bất kỳ gồm 2 bệnh nhân thể hiện DLT trong 4 tuần từ khi dùng liều dùng đầu tiên thì 4 bệnh nhân khác (tối đa là 6 bệnh nhân) sẽ được cho dùng ở mức liều dùng này. Với liều dùng bất kỳ mà không có trên một bệnh nhân trong số 6 bệnh nhân này gây độc tế bào lớn hơn cấp độ 3 thì các bệnh nhân tiếp theo sẽ được dùng ở mức liều dùng tiếp theo.

DLT được xác định mức độ gây đôc tế bào không sinh huyết cấp độ 3, hoặc độ gây độc tế bào sinh huyết cấp độ 4 như được xác định bằng NCI Common Terminology For Adverse Events (CTCAE phiên bản 3). MTD (Liều dùng tối đa được dung nạp) được xác định là mức liều dùng của ch806 dưới ngưỡng trong đó hai hoặc nhiều bệnh nhân trong số 6 bệnh nhân nêu trên có biểu hiện DLT.

Đánh dấu phóng xạ Ch806

ch806 dạng dùng cho thử nghiệm lâm sàng được bào chế tại Biological Production Facility of the Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Úc. Kháng thể ch806 được đánh dấu bằng ^{111}In (MDS Nordion, Kanata, Canada) thông qua chelat của ion kim loại hai chức năng CHX-A″-DTPA theo các phương pháp đã được mô tả trước đây (Scott et al. (2000) Cancer Res 60, 3254-3261; Scott et al. (2001) J. Clin. Oncol. 19(19), 3976-3987).

Chụp ảnh bằng máy ảnh tia gama

Các ảnh chụp toàn bộ cơ thể để phân tích sự phân bố sinh học của ^{111}In-ch806 được thực hiện ở tất cả các bệnh nhân vào ngày 0 sau khi truyền ^{111}In-ch806, tại ít nhất 3 thời điểm khác cho đến ngày 7 sau khi truyền. Các ảnh chụp cắt lớp phát xạ đơn photon (Single photon emission computed tomography - SPECT) của một vùng cơ thể mang u đã biết cũng được thực hiện vào ít nhất một thời điểm trong giai đoạn này. Tất cả các ảnh chụp bằng máy ảnh tia gamma đều được tiến hành chụp bằng máy ảnh tia gama hai đầu (Picker International, Cleveland, OH).

Dược động học

Các mẫu máu đùng để phân tích dược động học được thu nhận vào ngày 0 – trước khi truyền ^{111}In-ch806; sau đó vào thời điểm 5 phút, 60 phút, 2 giờ và 4 giờ sau khi truyền ^{111} In-ch806, ngày 1, ngày 2 hoặc 3, ngày 4 hoặc 5, và ngày 6 hoặc 7. Các

mẫu máu khác dùng để phân tích dược động học của protein ch806 cũng được lấy vào ngày 14 (± 2 ngày) và ngày 21 (± 2 ngày) và ngày 30 (± 2 ngày).

Các mẫu huyết thanh được chia thành hai phần giống nhau và được đếm trong máy đếm xung tia gama (Packard Instruments, Melbourne, Australia), cùng với chất chuẩn là ^{111}In thích hợp. Kết quả thu được đối với các mẫu huyết thanh này được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ % liều dùng được tiêm/lít (% ID/L). Việc xác định mức protein ch806 trong huyết thanh bệnh nhân sau mỗi lần truyền được tiến hành bằng quy trình đã được chấp thuận để xác định hóa miễn dịch protein ch806 trong huyết thanh người[40]. Giới hạn định lượng cho ch806 trong các mẫu huyết thanh là 70 ng/mL. Tất cả các mẫu được thử nghiệm được thực hiện ba lần và được pha loãng với hệ số ít nhất là 1:2. Các mức ch806 trong huyết thanh xác định được được biểu hiện bằng µg/mL.

Các phân tích dược động học được tiến hành trên các giá trị xác định được của ^{111}In-ch806 trong huyết thanh sau khi truyền, và ELISA xác định các mức protein ch806 trong huyết thanh bệnh nhân, bằng cách sử dụng chương trình xác định theo đường chuẩn (WinNonlin Pro Node 5,0,1, Pharsight Co., Mountain View, CA). Các đánh giá được xác định cho các thông số sau: T½α và T½β (thời gian bán hủy pha đầu và pha cuối của quá trình sắp xếp lại); V1, thể tích của gian trung tâm; Cmax (nồng độ tối đa trong huyết thanh); AUC (diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết thanh được ngoại suy với thời gian vô định); và CL (tổng độ thanh thải trong huyết thanh).

Độ thanh thải toàn thân và phép đo liều lượng ^{111}In-ch806 ở gan và u

Việc tính toán liều lượng toàn thân và ở các cơ quan bình thường (gan, phổi, thận và lá lách) được tiến hành dựa trên các vùng quan tâm ở từng bệnh nhân với bộ dữ liệu ảnh chụp sau khi truyền ^{111}In-ch806, điều này cho phép tính toán hoạt tính cộng dồn và phân tích sử dụng OLINDA cho kết quả đo liều lượng cuối cùng (Stabin et al. (2005) J. Nucl. Med. 46(6), 1023-1027). Các vùng quan tâm cũng được xác định đối với các khối u thích hợp ở từng thời điểm trên bộ dữ liệu ảnh chụp ^{111}In-ch806, được hiệu chỉnh đối với giá trị cơ sở và làm giảm, và việc tính toán liều lượng được tiến hành để thu được nồng độ ^{111}In-ch806 trong u/gm (Scott et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11(13), 4810-4817). Giá trị này được chuyển sang µg ch806/gm mô u dựa trên mg liều lượng protein ch806 được tiêm.

Phân tích HACA

Các mẫu máu dùng để đánh giá HACA được lấy trước khi truyền ch806, sau đó lấy hằng tuần cho đến 30 ngày sau khi truyền ch806. Các mẫu được phân tích bằng thử nghiệm ELISA, và bằng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng thiết bị BIAcore2000, như đã mô tả trước đây (Scott et al., 2005; Liu et al. (2003) Hybrid Hybridomics 22(4), 219-28; Ritter et al. (2001) Cancer Res. 61(18), 685-6859).

Phương pháp hóa mô miễn dịch

Mô u nhúng trong parafin được cố định trong formalin thu được từ mỗi bệnh nhân trong thử nghiệm được nhuộm màu miễn dịch như sau: Tóm tắt như sau, các lát cắt mô 4 µm được nhúng trong parafin được đưa lên các vật kính SuperFrost® Plus (Menzel-Glaser, Germany), loại bỏ parafin và tái hydrat hóa trước khi thử lại kháng nguyên trong lò vi sóng trong dung dịch Target Retrieval Solution, độ pH=6,0 (10 phút; Dako, Glostrup, Denmark). Các lát cắt sau đó được xử lý bằng H_2O_2 3% trong 10 phút, để loại bỏ peroxidaza nội sinh và ủ ở nhiệt độ phòng trong 60 phút với kháng thể 806 (4µg/ml) hoặc với nồng độ thích hợp của kháng thể đối chứng âm phù hợp về isotyp (IgG2b; Chemicon, Temecula, CA). Liên kết kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng Kit PowerVision (ImmunoVision Technologies, Brisbane, CA). Để có thể quan sát được sự nhuộm màu miễn dịch, các lát cắt được ủ với chất tạo màu 3-amino-9-etylcarbazol (0,4%, Sigma Chemical Co. MO, USA) trong 10 phút và nhuộm đối màu bằng Mayer's haematoxylin. Các đối chứng âm dùng cho quy trình nhuộm màu miễn dịch được chuẩn bị bằng cách bỏ đi kháng thể thứ nhất. Kết quả được biểu hiện dưới dạng % tế bào u dương tính nhuộm màu.

Phương pháp lai tại chỗ sinh màu

Mô u nhúng trong parafin được cố định trong formalin nhúng vào trong parafin thu được từ mỗi bệnh nhân trong thử nghiệm được cắt lát và đặt lên vật kính SuperFrost® Plus, loại bỏ parafin và tái hydrat hóa trước khi xử lý trước bằng Kit xử lý trước SpotLight® Tissue (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA). Các lát cắt sau đó được phủ bằng mẫu dò ADN EGFR SpotLight®, biến tính ở 95°C trong 10 phút và ủ qua đêm ở 37°C. Sau khi ủ, các vật kính được rửa trong 0,5 X SSC. Việc phát hiện của mẫu dò được tiến hành bằng cách sử dụng kit phát hiện polyme SpotLight® CISH™. Các lát cắt có các cụm tín hiệu hoặc có lớn hớn hoặc bằng 5 tín

hiệu rời rạc ở >25 % các tế bào ung thư được xem là có sự khuếch đại gen EGFR có mối liên quan với hoạt tính của m806

2. Kết quả

Bệnh nhân

Tám bệnh nhân (1 nữ và 7 nam; tuổi trung bình là 61 tuổi (khoảng 44-75)) hoàn thành thử nghiệm (Bảng 13). Các vị trí u thứ phát, trước tiền sử điều trị, và các vị trí bệnh khi bắt đầu nghiên cứu cũng được nêu trong Bảng 13. Tất cả 8 bệnh nhân đều dương tính với kháng nguyên 806 ở các khối u thu nhận (Bảng 13).

Tất cả các bệnh nhân đều đáp ứng các tiêu chuẩn hội tụ và, ngoại trừ bệnh nhân số 8 (người bị u não thứ phát), tất cả đều bị bệnh di căn khi bắt đầu nghiên cứu. Các vị trí bệnh di căn được chia vào nhóm các thương tổn đích bao gồm: phổi (5 bệnh nhân), não (1 bệnh nhân), hạch lympho (1 bệnh nhân), thượng thanh môn (1 bệnh nhân). Các vị trí khác bị bệnh di căn (các thương tổn không phải là đích) bao gồm khối thượng thận, xương và hạch lympho (Bảng 13). Tình trạng chức năng hoạt động Karnofsky trung bình là 90 (nằm trong khoảng từ 80 đến 100).

Bảng 13

Đặc điểm của bệnh nhân

Bệnh nhân số	Liều dùng (mg/m^2)	Tuổi (năm)	Giới tính	KPS (%)	Vị trí u thứ phát	IHC của tế bào có kết quả dương tính (%)	Các liệu pháp điều trị trước đó	Vị trí di căn trước khi nghiên cứu	Đáp ứng u với ch806
1	5	71	M	10	NSCLC	50-75	RT	Phổi, thận	PD
8	5	44	M	90	U sao bào mất biệt hóa	>75*	Phẫu thuật, RT, CT	Não	SD
2	10	49	F	80	SCC ở hậu môn	<10	Hóa trị liệu, RT	LN, phổi, Xương	SD
3	10	75	M	90	NSCLC	50-75	Phẫu thuật RT	Phổi	SD
4	20	52	M	100	Ruột	<10†	Phẫu	Phổi, LN	PD

Bệnh nhân số	Liều dùng (mg/m^2)	Tuổi (năm)	Giới tính	KPS (%)	Vị trí u thứ phát	IHC của tế bào có kết quả dương tính (%)	Các liệu pháp điều trị trước đó	Vị trí di căn trước khi nghiên cứu	Đáp ứng u với ch806
							thuật, CT		
5	20	65	M	80	Caxinom trung biểu mô	>75	RT, CT	Phổi	SD
6	40	59	M	80	SCC ở dây thanh quản	>75	Phẫu thuật, RT, CT	Mô mềm	SD
7	40	71	M	90	SCC ở da	50-75	Phẫu thuật, CT	Phổi, LN	PD

Các từ viết tắt: F = nữ; M = nam; NSCLC = Caxinom phổi tế bào không nhỏ; SCC = Caxinom tế bào vảy; RT = điều trị bằng phóng xạ; CT = hóa trị liệu; LN = hạch lymphô; PD = bệnh tiến triển; SD = bệnh thích hợp * dương tính đối với sự biểu hiện de2-7 EGFR (nghĩa là biểu hiện de2-7 EGFR) † dương tính với sự khuếch đại gen EGFR (nghĩa là, có sự khuếch đại gen EGFR)

Tác dụng phụ và HACA

Tác dụng phụ liên quan đến ch806 được liệt kê trong Bảng 14 và 15. Không quan sát thấy các tác dụng phụ liên quan đến việc truyền. Không có DLT, và do đó, MTD không đạt được. Tính độc chủ yếu trong quan niệm của người nghiên cứu có thể do ch806 tạo ra là: ngứa tạm thời, buồn nôn, nhức mỏi/bơ phờ, và các ảnh hưởng khác có thể đến mức ALP và GGT trong huyết thanh. Quan sát thấy tăng CTC cấp độ 2 trong mức GGT ở bệnh nhân 5, tuy nhiên đây là so với ban đầu có giá trị cơ sở tăng cấp độ 1, và về bản chất có tính tạm thời. Có ba tác dụng phụ nghiêm trọng (serious adverse events - SAE) được báo cáo, nhưng đều không phải do ch806 gây ra. Tóm lại, ch806 là an toàn và được dung nạp tốt ở tất cả các mức liều dùng với độc tính nhỏ thường có thể lường trước và có thể kiểm soát được. Việc tăng liều lượng không được tiến hành do lượng cGMP ch806 giới hạn của thử nghiệm này là có sẵn.

Đáp ứng miễn dịch dương tính với ch806 (phù hợp với cả hai phương pháp là ELISA và BIAcore) được quan sát thấy ở chỉ một trong số 8 bệnh nhân nêu trên (Bệnh nhân 1).

Bảng 14
Tần suất xuất hiện các tác dụng phụ liên quan đến ch806

	Mức liều dùng (mg/m^2)*				Số lần xuất hiện của từng tác dụng phụ
Tác dụng phụ	5	10	20	40	
Choáng váng	0	0	0	1	1
Nhức mỏi	0	0	1	0	1
Bơ phờ	0	0	0	1	1
Cảm giác thèm ăn bị ức chế	0	0	0	1	1
Buồn nôn	0	1	0	1	2
Ngứa	1	0	0	0	1
ALP – tăng	0	0	1	0	1
GGT – tăng	0	0	1	0	1
Tổng	1	1	3	4	9

* Số liệu là số lần xuất hiện của tác dụng phụ bất kỳ ở mỗi mức liều dùng

Bảng 15
Sự xuất hiện của tác dụng phụ liên quan đến hợp chất được thử nghiệm

Mức liều dùng (mg/m^2)	Độc tính lớn nhất cấp CTC *			
	1 (Nhẹ)	2 (Trung bình)	3 (Nghiêm trọng)	4 (Đe dọa tính mạng)
5	1	0	0	0
10	1	0	0	0
20	2	1	0	0
40	4	0	0	0
Tổng	8	1	0	0

* Số bệnh nhân

Đánh dấu phóng xạ ch806

Tổng số lần truyền ^{111}In-ch806 được dùng trong thử nghiệm là 8. Độ tinh khiết hóa chất phóng xạ trung bình (± độ lệch chuẩn) và hoạt tính miễn dịch của ^{111}In-ch806 lần lượt được xác định là 99,3 ± 0,1 % và 77,4 ± 7,0 %.

Phân bố sinh học của ch806

Mẫu phân bố sinh học ban đầu của ^{111}In-ch806 ở bệnh nhân ở tất cả các mức liều dùng phù hợp với hoạt tính của máu toàn phần, thanh thải dần theo thời gian. Một tuần sau khi tiêm, mức dung nạp ^{111}In-ch806 của gan và lá lách phù hợp với sự độ thanh thải bình thường của các chất chuyển hóa ^{111}In-chelat thông qua hệ thống lưới nội mô.

Vị trí cụ thể của ^{111}In-ch806 được quan sát ở trong các thương tổn đích (≥ 2cm) ở tất cả bệnh nhân ở tất cả các mức liều dùng (Fig.94), bao gồm các thương tổn đích nằm trong phổi (bệnh nhân 1, 3, 4, 5 và 7), vùng bụng (bệnh nhân 1 và 2), và vùng trên dây thanh quản ở bên phải cổ (bệnh nhân 6). Mức dung nạp ^{111}In-ch806 cao trong u não (bệnh nhân 8) cũng được quan sát thấy (Fig.95). Quan trọng là, mức dung nạp ^{111}In-ch806 ở u không phụ thuộc vào mức biểu hiện kháng nguyên 806. Ví dụ, bệnh nhân 4 có mức dung nạp cao ở các thương tổn đích ở cả hai lá phổi, mặc dù <10% dương tính bởi IHC đối với hoạt tính 806 ở u được thu nhận (Fig.96). Mức dung nạp ^{111}In-ch806 này ở các thương tổn đích ở Bệnh nhân 4 tương đương với mức dung nạp quan sát được ở bệnh nhân 3, trong đó 50-75% tế bào u dương tính với việc nhuộm màu kháng nguyên 806 trên hóa mô miễn dịch mẫu thu nhận (Fig.96).

Dược động học

Các thông số dược động học T½α và T½β, V1, Cmax, AUC và CL cho từng bệnh nhân với từng lần truyền ^{111}In-ch806 được nêu trong Bảng 16. Phép thử tổng hàng Kruskal-Wallis được áp dụng cho thời gian bán hủy alpha và beta, V1 và độ thanh thải. Không thấy có sự khác biệt ý có nghĩa thống kê giữa các mức liều dùng (P>0,05).

Đường cong dược động học phù hợp với số liệu ELISA mật độ gộp được nêu trong Fig.97. Các thông số dược động học trung bình ± sai số chuẩn: T½α = 29,16 ± 21,12 giờ, T½β = 172,40 ± 90,85 giờ, V1 2984,59 ± 91,91 ml, và CL 19,44 ± 4,05 ml/giờ. Số liệu nồng độ cực đại và nồng độ ch806 cực tiểu trong huyết thanh xác định được (C_{max} và C_{min}) được nêu trong Bảng 17 đối với mỗi bệnh nhân. Như mong đợi, các mối quan hệ tuyến tính được quan sát thấy đối với C_{max} và C_{min} với mỗi mức liều dùng. Số liệu dược động học ELISA của ch806 (giá trị trung bình + độ lệch chuẩn) được xác định gần như tương đương với số liệu dược động học thu được của ^{111}In-ch806 (Bảng 16).

Bảng 16

Đánh giá thông số dược động học (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn) cho ^{111}In-CHX-A″-DTPA-ch806 ở từng mức liều dùng và tất cả các liều dùng.

Mức liều dùng	T ½ α (giờ)	T ½ β (giờ)	V1 (mL)	CL (mL/ giờ)	AUC (giờ *mg/mL)

(mg/m^2)	Trung bình	SD	Trung bình	SD	Trung bình	SD	Trung bình	SD	Trung bình	SD
5	10,91	3,4	183,9	110,2	2963,06	493,23	21,97	16,59	541,17	371,75
10	11,75	4,4	124,5	9,25	3060,29	721,70	28,58	8,60	566,79	26,39
20	9,34	8,3	125,3	73,66	2902,06	1064,77	30,98	21,65	1438,12	957,18
40	8,95	3,2	133,9	10,79	4742,42	169,10	37,99	6,47	2269,04	381,68
ALL	10,24	1,32	141,90	28,30	3416,96	886,04	29,88	6,61		

Bảng 17

Mức ch806 cực đại (Cmax) và cực tiểu (Cmin) được xác định bằng phép phân tích ELISA

Bệnh nhân số	Mức liều dùng (mg/m^2)	C_{max}* (µG/ML)	C_{min}* (µG/ML)
1	5	1,38 ± 0,02	0,10 ± 0,05†
8	5	1,52 ± 0,17	0,96 ± 0,08
2	10	5,92 ± 0,11	1,50 ± 0,01
3	10	6,27 ± 0,45	1,83 ± 0,20
4	20	12,25 ± 0,66	4,05 ± 0,05
5	20	11,22 ± 0,77	1,58 ± 0,04
6	40	27,76 ± 2,10	6,90 ± 0,38
7	40	32,32 ± 0,84	6,80 ± 0,13

* C_{max} = 60 phút sau khi tiêm.; C_{min} = mức huyết thanh Ngày 7 ÷ Ngày 8

Xác định liều lượng ^{111}In-ch806

Độ thanh thải toàn thân là giống nhau ở tất cả bệnh nhân và ở tất cả các liều dùng, với $T_{1/2}$sinh học (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn) là 948,6 ± 378,6 giờ. Do thời gian bán hủy sinh lý tương đối ngắn nên việc tính toán thời gian bán hủy sinh học là cực nhạy so với những thay đổi nhỏ ở thời gian bán hủy hiệu dụng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa độ thanh thải toàn thân giữa các liều dùng (phép thử tổng hàng Kruskal-Wallis: giá trị P = 0,54) (Fig.98).

Độ thanh thải của ^{111}In-ch806 khỏi các cơ quan thông thường (gan, phổi, thận và lá lách) không có sự khác biệt giữa các liều dùng, và giá trị $T_{1/2}$ hiệu dụng xác định là 78,3, 48,6, 69,7 và 66,2 giờ tương ứng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về độ thanh thải giữa các cơ quan. Cụ thể, độ thanh thải qua gan không có sự khác biệt giữa các liều dùng (Fig.98), điều đó cho thấy rằng kháng nguyên có thể không có khả năng bão hòa trong gan đối với ch806.

Phân tích xác định liều lượng trong u được tiến hành trên 6 bệnh nhân. Bệnh nhân 1 và 2 xuất hiện các thương tổn đích ở khoang tim, hoặc vận động khi chụp hình, vốn làm sai lệch kết quả phân tích. Mức dung nạp ^{111}In-ch806 cực đại xác định được vào thời điểm 5-7 ngày sau khi truyền, và vào khoảng 5,2-13,7 x 10^{-3} % liều dùng được tiêm/gm mô u.

Đánh giá hoạt tính trong lâm sàng

Kết thúc thử nghiệm kéo dài 5 tháng, phát hiện thấy 5 bệnh không tiến triển, và 3 bệnh nhân có tiến triển (Bảng 13). Điều đáng quan tâm là, 1 bệnh nhân (Bệnh nhân 7, liều dùng 40 mg/m^2) có bằng chứng trong lâm sàng cho thấy sự suy giảm tạm thời hạch lymphô có thể sờ thấy trong tâm nhĩ (được chứng minh là SCC di căn khi chọc hút bằng kim nhỏ) trong suốt thời gian thử nghiệm, điều này cho thấy rằng ch806 có thể có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, bệnh nhân được khẳng định có bệnh tiến triển bằng RECIST khi kết thúc nghiên cứu.

Số liệu bổ sung

8 bệnh nhân (1 nữ và 7 nam; tuổi trung bình là 61 tuổi (khoảng 44-75)) hoàn thành thử nghiệm pha 1 như đã thông báo (Scott et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 4071-4076). Tất cả số bệnh nhân này đều đáp ứng tất cả các tiêu chuẩn và, ngoại trừ bệnh nhân 8 (người có u não khởi phát), tất cả có bệnh di căn khi bắt đầu nghiên cứu. Mức dung nạp Ab ở mô được quan sát ở tất cả bệnh nhân, và ^{111}In-ch806, phiên bản được khảm hóa của mAb806, thể hiện sự dung nạp nhanh chóng và mức dung nạp cao ở u (Fig.71). Độ thanh thải của ^{111}In-ch806 ở các cơ quan thông thường (gan, phổi, thận và lá lách) không có sự khác biệt giữa các liều dùng (Scott et al., 2007). Cụ thể, độ thanh thải qua gan không có sự khác biệt đáng kể giữa các liều dùng, điều này cho thấy gian kháng nguyên ở gan không thể bão hòa đối với ch806. Tổng mức dung nạp ở gan lớn nhất là 14,45 ± 2,43 %ID ngay sau khi truyền, và giảm xuống 8,45 ± 1,63 %ID sau 72 giờ, và 3,18 ± 0,87 %ID một tuần sau khi truyền. Điều này hoàn toàn trái ngược với mức dung nạp của các kháng thể với wtEGFR (ví dụ 25), mà được chỉ ra là đạt hơn 30 %ID ở gan (đối với liều dùng 40mg) 3 ngày sau khi truyền (Divgi et al. (1991) J. Natl. Cancer Inst. 83, 97-104). Mức dung nạp ^{111}In-ch806 cực đại ở mô xác định được xảy ra trong 5-7 ngày sau khi truyền. Việc định lượng mức dung nạp của mô ở Bệnh nhân 1 và 3 có thể không được tiến hành một cách chính xác do thương tổn đích gần với khoang tim và do sự vận động của bệnh nhân. Mức dung nạp ch806 cực đại ở u nằm trong khoảng từ 5,21 đến 13,73×10^{-3} %ID/gm mô u. Việc tính toán nồng độ ch806 thực tế thể hiện giá trị cực đại (trung bình ± SD) 0,85 ± 0

µg/gm (5mg/^{m2}), 0,92 ± 0 µg/gm (10mg/^{m2}), 3,80 ± 1,10 µg/gm (20mg/m^2), và 7,05 ± 1,40 µg/gm (40mg/m^2).

Thảo luận

Như được nêu trong Ví dụ này, nghiên cứu này đưa ra minh chứng đã được thông báo đầu tiên về phân bố sinh học và việc tạo đích u của kháng thể khảm dựa trên epitop chỉ được lộ diện trên các dạng biểu hiện quá mức, đột biến hoặc được phối tử hoạt hóa của EGFR. Ch806 thể hiện việc hướng đích rất tốt cho nhiều vị trí u ở tất cả bệnh nhân, không có bằng chứng cho thấy có sự dung nạp ở các mô bình thường, và không có độc tính đáng kể. Các đặc tính *in vitro* và *in vivo* này của ch806 cho phép phân biệt nó với tất cả các kháng thể khác có đích là EGFR.

Ở liều dùng lên đến 40mg/m^2, ch806 được dung nhận tốt, không quan sát thấy DLT và MTD cũng không đạt. Độc tính chủ yếu có thể do ch806 tạo ra là ngứa tạm thời, buồn nôn, nhức mỏi/bơ phờ trên mức ALP và GGT trong huyết thanh. Bản chất tiến triển của các u ác ở bệnh nhân cho thấy bệnh của họ cũng có thể là yếu tố góp phần tạo ra các tác dụng phụ này. Một trong số các tác dụng phụ này cũng có thể liên quan đến dược chất nghiên cứu, tất cả những tác dụng phụ này đều ở mức nhẹ, nhiều trong số đó tự hết, và không tác dụng nào cần phải điều trị bằng thuốc. Quan trọng là, không quan sát thấy sự phát ban ở da và rối loạn tiêu hóa ở bệnh nhân bất kỳ ngay cả ở liều dùng cao nhất. Khả năng dung nạp tốt của ch806 ở nghiên cứu liều dùng đơn này chứng minh cho bước thử nghiệm tiếp trong các thử nghiệm liều dùng nhắc lại.

Phân bố sinh học của ch806 ở tất cả bệnh nhân cho thấy sự thanh thải dần hoạt tính trong khoang máu, và ^{111}In-ch806 không được hấp thu của mô bình thường xác định. Sự hấp thu tuyệt vời ch806 cũng rất rõ ràng ở tất cả bệnh nhân, bao gồm các u di căn ở phổi, hạch lymphô, và các u di căn ở thận, và trong u trung biểu mô và u thần kinh đệm. Điều này được quan sát ở tất cả các liều dùng bao gồm 5mg/m^2 (liều dùng thấp nhất được nghiên cứu), từ 1/10 đến 1/12 liều dùng cần để quan sát thấy sự hấp thu các kháng thể khác wtEGFR[33] ở u. Sự khác biệt trong mức hấp thu ch806 so với các kháng thể khác wtEGFR có thể do sự hấp thu của các mô bình thường và quan trọng (gan và da) do wtEGFR đóng vai trò như bộ góp kháng nguyên[33]. Ngoài ra, sự khu biệt của ^{111}In-ch806 cao ngay cả ở bệnh nhân có mức biểu hiện 806 thấp được đánh giá bởi hóa mô miễn dịch các mẫu u thu được (Fig.96). Sự hấp thu ^{111}In-ch806 ở u thần kinh đệm đặc biệt ấn tượng (Fig.97), và tương đương với số liệu bất kỳ đã được công bố về việc tạo đích u não bằng kháng thể sau khi truyền toàn thân hoặc thậm chí truyền khu

trú. Số liệu này cho thấy tính chọn lọc đặc trưng của ch806 đối với EGFR được biểu hiện trong rất nhiều u, và khác định việc thiếu sự hấp thu kháng thể này ở mô bình thường ở người.

Các phân tích dược động học cho thấy ch806 có thời gian bán hủy cuối lớn hơn một tuần, và sự thanh thải ^{111}In-ch806 trong huyết thanh không phụ thuộc liều dùng. Mối quan hệ tuyến tính của AUC, Cmax và Cmin cũng được quan sát thấy, ở các liều dùng lớn hơn 10mg/m^2 tạo ra vùng lõm của nồng độ trong huyết thanh lớn hơn 1 μg/mL. Các giá trị V1, Cl, T½ α và T ½ β ổn định giữa các liều dùng, và thích hợp với các kháng thể IgG1 điển hình ở người (Scott et al., 2005; Steffens et al. (1997) *J. Clin. Oncol* 15, 1529-1537; Scott et al. (2001) J. Clin. Oncol. 19(19), 3976-3987). Độ thanh thải của ch806 cũng được xác định là thấp hơn khi các tính toán đối với ch806 trong ELISA tương đương với các giá trị xác định được của ^{111}In-ch806. Trong khi sự khác biệt này có thể giải thích được trên một số nhỏ bệnh nhân được nghiên cứu thì việc lấy mẫu ở thời điểm lâu lâu trong thử nghiệm ELISA đối với ch806 cũng sẽ hỗ trợ giá trị này dưới dạng là đại diện cho sự thanh thải của ch806 đúng đắn. Các số liệu dược động học của ch806 tương đương với các số liệu dược động học của các kháng thể khảm khác đã được thông báo (Steffens et al., 1997; Scott et al., 2001), và hỗ trợ cho chế độ dùng hằng tuần của ch806.

Kết quả của thử nghiệm định liều và các phân tích dược động học cho thấy không có gan mô bình thường có thể bão hòa đối với ch806 đối với các mức liều dùng được đánh giá trong thử nghiệm này. Quan trọng là, dược động học và sự thanh thải toàn thân và qua gan không phụ thuộc vào liều dùng, khác biệt rất lớn đối với kết quả của các nghiên cứu đã được thông báo đối với kháng thể kháng wtEGFR (Baselga J. và Artega C.L. (2005) J. Clin. Oncol. 23, 2445-2449; Divgi et al. J. Natl. Cancer Inst. 83(2), 97-104; Baselga J (2001) Eur. J. Cancer 37 Suppl. 4, S16-22; Gibson et al. (2006) Clin. Colorectal Cancer 6(1), 29-31; Rowinsky et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22, 3003-3015; Tan et al. (2006) Clin. Cancer Res. 12(21), 6517-6522) hỗ trợ cho tính đặc hiệu u và thiếu liên kết với ch806 của mô bình thường ở người. Kết quả quan sát này là bằng chứng có tính thuyết phục về hoạt lực của ch806 (hoặc các dạng được làm giống như của người) đối với EGFR đích chọn lọc ở u, tránh được độc tính thường gặp của các kháng thể EGFR và các chất ức chế kinaza khác (cụ thể là đối với da) và có khả năng cho hiệu quả điều trị cao hơn. Hơn thể nữa, khả năng phân phối lượng (do sự thu nhận nhanh chóng mAb806 ở các tế bào u) và việc điều trị kết hợp các chất sinh học khác như các kháng thể EGFR và các chất ức chế tyrosin kinaza, ở đây độc tính

kết hợp chắc chắn được giảm thiểu, được hỗ trợ mạnh mẽ bằng số liệu từ thử nghiệm này. Thử nghiệm này đã cung cấp bằng chứng rõ ràng cho thấy khả năng nhắm vào epitop trên EGFR đặc hiệu với u, và việc tiếp tục phát triển cách tiếp cận đặc trưng trong lâm sàng của liệu pháp điều trị ung thư.

Ví dụ 26. So sánh trình tự

Các CDR của chuỗi VH và chuỗi VL của mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, và hu806 được nêu và so sánh dưới đây.

Bảng 18

So sánh trình tự isotyp và CDR của kháng thể ở chuột nhắt (Kabat)[1]

A. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

	CDR1	**CDR2**	**CDR3**
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:18)	HGTNLDD (SEQ ID NO:19)	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:20)
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:28)	HGTNLDD (SEQ ID NO:29)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:30)
175 (IgG2a)	HSSQDISSNIG (SEQ ID NO:135)	HGTNLED (SEQ ID NO:136)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:38)	HGTNLDD (SEQ ID NO:39)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:40)

B. Vùng biến đổi của chuỗi nặng

	CDR1	**CDR2**	**CDR3**
806 (IgG2b)	SDFAWN (SEQ ID NO:15)	YISYSGNTRYNPSLKS (SEQ ID NO:16)	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:17)
124 (IgG2a)	SDYAWN (SEQ ID NO:23)	YISYSANTRYNPSLKS (SEQ ID NO:24)	ATAGRGFPY (SEQ ID NO:25)
175 (IgG2a)	SDYAWN (SEQ ID NO:130)	YISYSANTRYNPSLKS (SEQ ID NO:131)	ATAGRGFPY (SEQ ID NO:132)
1133 (IgG2a)	SDYAWN (SEQ ID NO:33)	YISYSGNTRYNPSLRS (SEQ ID NO:34)	ATAGRGFPY (SEQ ID NO:35)

[1]sự khác nhau giữa các trình tự CDR của mAb806 được gạch chân

Các CDR được nêu ở trên cho các isotyp của kháng thể tương ứng dựa trên phương pháp phân tích Kabat. Như đã được các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ, các CDR có thể cũng được xác định dựa trên phương pháp phân tích khác, ví dụ kết hợp của cách xác định theo Kabat và Chothia. Ví dụ, áp dụng phép phân tích Kabat và Chothia kết hợp cho các isotyp ở trên, các trình tự của các CDR thuộc chuỗi

VL và các CDR thuộc chuỗi VH của các isotyp tương ứng là như được nêu trong Bảng 14.

Bảng 14

So sánh trình tự isotyp và CDR của kháng thể ở chuột nhắt (Kết hợp cách xác định Kabat và cách xác định Chothia)[1]

A. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:18)[2]	HGTNLDD (SEQ ID NO:139)[2]	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:20)[2]
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:28)	HGTNLDD (SEQ ID NO:140)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:30)
175 (IgG2a)	HSSQDISSNIG (SEQ ID NO:135)	HGTNLED (SEQ ID NO:141)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:38)	HGTNLDD (SEQ ID NO:142)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:40)

B. Vùng biến đổi của chuỗi nặng

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	GYSITSDFAWN (SEQ ID NO:143)[3]	GYISYSGNTRYNPSLKS (SEQ ID NO:144)[3]	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:17)[3]
124 (IgG2a)	GYSITSDYAWN (SEQ ID NO:145)	GYISYSANTRYNPSLKS (SEQ ID NO:146)	ATAGRGFPY (SEQ ID NO:25)
175 (IgG2a)	GYSITSDYAWN (SEQ ID NO:147)	GYISYSANTRYNPSLKS (SEQ ID NO:148)	ATAGRGFPY (SEQ ID NO:132)
1133 (IgG2a)	GYSITSDYAWN (SEQ ID NO:149)	GYISYSGNTRYNPSLRS (SEQ ID NO:150)	ATAGRGFPY (SEQ ID NO:35)

[1]sự khác nhau giữa các trình tự CDR của mAb806 được gạch chân

[2]Xem Fig.17 của US 10/145,598 (US 7,589,180)

[3]Xem Fig.16 của US 10/145,598 (US 7,589,180)

Bảng 15

So sánh trình tự của CDR của mAb806 và hu806 (Kabat)[1]

A. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb806	HSSQDINSNIG	HGTNLDD	VQYAQFPWT

	(SEQ ID NO:18)	(SEQ ID NO:19)	(SEQ ID NO:20)
hu806	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:49)	HGTNLDD (SEQ ID NO:50)	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:51)

B. Vùng biến đổi của chuỗi nặng

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb806	SDFAWN (SEQ ID NO:15)	YISYSGNTRYNPSLKS (SEQ ID NO:16)	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:17)
hu806	SDFAWN (SEQ ID NO:44)	YISYSGNTRYQPSLKS (SEQ ID NO:45)	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:46)

[1]sự khác nhau giữa các trình tự CDR của mAb806 được gạch chân

Như được nêu ở trên, trình tự CDR của isotyp của mAb806, mAb175, mAb124 và mAb1133 giống nhau ngoại trừ các thay đổi đối với các axit amin có tính bảo toàn cao được mong đợi tạo ra sự gấp nếp protein tương đồng để nhận biết epitop. Số liệu này, cũng với số liệu về liên kết và số liệu khác được cung cấp trong các Ví dụ ở trên, cho thấy các isotyp này và hu806 là các biến thể thành viên thuộc họ có quan hệ mật thiết với nahu có cùng các đặc trưng được thảo luận ở trên như đối với mAb806 (ví dụ, liên kết với epitop trên EGFR mà có thể tiếp cận được chỉ để liên kết trong các dạng EGFR được biểu hiện quá mức, đột biến hoặc được phối tử hoạt hóa) và cho thấy các kháng thể có trình tự vùng biến đổi khác nhau, cụ thể là trình tự CDR thay đổi có cùng đặc trưng và khả năng liên kết.

Tài liệu tham khảo

Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86,3778-3781.

Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M. E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80, 1605-1611.

Arteaga, C. 1. and Baselga, J. (2004) Cancer Cell. 5, 525-531.

Ashley, D. M., Batra, S. K., and Bigner, D. D. "Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors." J. Neurooncol., 35 : 259-273,1997.

Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., and Kumar, R. "Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor a." Cancer Res., 52 : 3335-3339, 1992.

Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. "Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin." J. Clin. Oncol. 2000; 18: 904-14.

Baselga, 1. (2006) Science. 312, 1175-1178.

Baselga, J. and Arteaga, C. L. (2005) J. Clin. Oncol. 23,2445-2459.

Baselga, J. Clinical trials of Herceptin (R) (trastuzumab). Eur. J. Cancer, 37 : 1824,2001.

Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." Cancer Res., 58: 2825-2831, 1998.

Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., and Mendelsohn, J. "Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda), 85: 1327-1333,1993.

Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. "Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin." J. Clin. Oncol. 18 : 904, 2000.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C, Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, 1. C., and Norton, L. "Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-pl85HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." J. Clin. Oncol., 14 : 737-744,1996.

Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. "Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene." Cell Growth Differ. 1995; 6: 1251-9.

Bernier, J. (2006) Expert. Rev Anticancer Ther. 6, 1539-1552.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotype vaccines for immunotherapy." Curr. Opin. Mol. Ther. 3(1) : 63-9. Biol. Cell. 13,4029-4044.

Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 15024-15029.

Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., et al. "Malignant astrocytomas được điều trị bằng iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase I trial." Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 22 : 225-230, 1992.

Brown, G. and N. Ling (1988). Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume 1. A Practical Approach. D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. x., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) Mol. Cell. 12,541-552.

Chao, G., Cochran, 1. R, and Wittrup, K. D. (2004) J. Mol. Biol. 342,539-550.

Cho, H. S. and Leahy, D. J. (2002) Science 297, 1330-1333.

Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. x., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., DelUley, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) Nature 421, 756-760.

Clarke, K., et al., "*In vivo* biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice." Cancer Res, 2000. 60(17): p. 4804-11.

Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., and Scott, A. M. "Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3S 193 radioimmunotherapy in

a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy." Clin. Cancer Res., 6 : 3621-3628, 2000.

Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2005) J. Biol. Chem. 280, 30392-30399.

Daugherty BL, DeMartino JA, Law MF, Kawka DW, Singer II, Mark GE. "Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins." Nucleic Acids Res. 1991 19(9):2471-6.

de Larco, J. E. and Todaro, G. J. (1978) J. Cell. Physiol. 94, 335-342.

de Larco, J. E., Reynolds, R., Carlberg, K., Engle, C., and Todaro, G. J. (1980) J. Biol. Chem. 255,3685-3690.

den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In : P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology, Second Edition, pp. 2424 31. London: Academic Press, 1998.

DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. "A new era for radiolabeled antibodies in cancer?" Curr. Opin. Immunol. 1999; 11: 563-9.

Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., et al. "Phase I and imaging trial of indium 11-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma." J. Natl. Cancer Inst., 83 : 97-104,1991.

Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor." Growth Factors. 18 : 11-29, 2000.

Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000)."Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." Growth Factors 18 (1):11-29.

Safa, M. M. and K. A. Foon (2001)."Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers. "Semin. Oncol. 28 (1) : 68-92.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. "Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N-or C-terminal tails." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 4309-13.

Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., and Collins, V. P. (1991) Cancer Res. 51,2164-2172.

Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Acta crystallographica 60, 2126-2132.

Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. "A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas." Neurosurgery (Baltimore), 39 : 478-483, 1996.

Fairlie, W. D., Uboldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. 1, Nicola, N. A., and Baca, M. (2002) Protein expression and purification 26, 171-178.

Fan, Z., and Mendelsohn, J. "Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies." Curr. Opin. Oncol., 10 : 67-73,1998.

Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. "Antitumor effect of antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts." Cancer Res., 53 : 4637-4642,1993.

Fan, Z., Masui, H., Altas, I., and Mendelsohn, J. "Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." Cancer Res., 53: 4322-4328, 1993.

Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A. "Expression of activated-epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogenactivated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens." Neurosurgery (Baltimore), 45 : 1442-1453, 1999.

Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) Mol. Cell 11, 507-517.

Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. "Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an

aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/deEGFR) expressed in cancer cells." J. Biol. Chem. 2001; 276: 5375-83.

Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. "MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF." Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985; 128: 898-905.

Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., and Buick, R. N. "Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants." Mol. Cell. Biol., 7 : 251-257, 1987.

Gadella, T. W. J. and Jovin, T. M. (1995) Journal of Cell Biology 129,1543-1558.

Gan H.K., Walker F., Burgess A.W., Rigopoulos A.., Scott A.M. and Johns T.G. "The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor AG1478 Increases the Formation of Inactive Untethered EGFR Dimers: Implications For Combination Therapy With Monoclonal Antibody 806." J. Biol. Chem. (2007);282(5):2840-50.

Garcia de Palazzo, I.E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-smalt cell along carcinomas." Cancer Res., 53: 3217-3220, 1993.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. 0., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2002) Cell, 110, 763-773.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. 0., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. c., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003) Mol. Cell. 11 ,495-505.

Gill, G. N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J. D., Masui, H., McLeod, C., and Mendelsohn, J. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7755-7760.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." Clin. Cancer Res. 1995; 1: 1311-8.

Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Tweardy, D. J. "Levels of TGP-a and BOFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival." J. Natl. Cancer Inst., 90: 32CE, 1998.

Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. "Monoclonal antibody therapy for solid tumors." Cancer Treat. Rev., 26 : 269-286,2000.

Gunther, N., Betzel, C., and Weber, W. "The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor ligand complex." J. Biol. Chem. 265:22082-5, 1990.

Halaisch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. P., and Ohnuma, T. "Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA." J. Neurosurg., 92: 297-305, 2000.

Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. "Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. Cancer Res." 56:3859-3861, 1996.

Harari, D., and Yarden, Y. "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." Oncogene, 19 : 6102-6114,2000.

Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. "Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody." Int. J. Cancer 1995; 63: 537-43.

Hogg, P. J. (2003) Trends in biochemical sciences 28, 210-214.

Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44:195-217., 195-217.

Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) Nature 381,272.

Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling." J. Biol. Chem. 1997; 272: 2927-35.

Humphrey, P. A., Wong, A. 1., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. "Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma" (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4207-4211.

Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Cavenee WK, Scott AM and Furnari FB. "The efficacy of EGFR-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status and heterodimerization." Clin. Cancer Res. (2007);13(6): 1911-1925.

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, Gullick WJ, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "Novel monoclonal antibody specific for the DE2-7 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene." Int. J. Cancer (2002) 98: 398-408

Johns, T.G., Adams, T.E., Cochran, J.R., Hall, N.E., Hoyne, P.A., Olsen, M.J., Kim, YS., Rothacker, J., Nice, E.C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Ward, C.W., Burgess, A.W., Wittrup, K.D., and Scott, A.M. "Identification of the Epitope for the EGFR-Specific Monoclonal Antibody 806 Reveals that it Preferentially Recognizes an Untethered Form of the Receptor." J. Biol. Chem. (2004) 279: 30375-30384

Johns, T.G., et al., "Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene." Int. J. Cancer, 2002. 98(3): p. 398-408.

Johns, T.G., Luwor, R.B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A.A., Perera, R.M., Old, L.J., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Scott, A.M. "Anti-tumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor AG1478." PNAS (2003) 100: 15871-15876.

Johns, T.G., Mellman I., Cartwright G.A., Ritter G., Old L.J., Burgess A. W. and Scott A.M. "The anti-tumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose

form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells over-express the receptor." FASEB J. (2005) 19(7):780-2.

Jorissen, R. N., Walker, F. W., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., and Burgess, A. W. "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling." Exp. Cell Res. 284,31-53.2003.

Jungbluth, A.A., Stockert, E., Huang, H-J.S., Collins, VP, Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns T.G., Scott A..M., Gullick W.J., Ritter, G., Cohen L., Cavanee W.K., Old, L.J. A "Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over- Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor." PNAS (2003) 100: 639- 644.

Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. "Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 163 cases." J. Clin. Pathol., 52,-574-580, 1999.

Kwok TT, Sutherland RM. "Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors." Br. J. Cancer 1991; 64: 251-4.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) J. Appl. Cryst. 26, 283-291.

Lee F.T., Mountain A.J., O'Keefe G.J., Sagona J., Rigopoulos A., Smyth F.E., Govindan S.V., Goldenberg D.M., Old L.J. and Scott A.M. "ImmunoPET detection of xenografts expressing de2-7 EGFR using Iodine-124 labelled ch806 via residualising ligand IMPR4." J. Nucl. Med. (2006) 47 (5) suppl 1: 429P.

Li D., Ji H., Zaghlul S., McNamara K., Liang M.C., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chirieac L.R., Padera R.F., Scott A.M., Jungbluth, A.A., Cavenee W.K., Old L.J., Demetri G.D., Wong KK. "Therapeutic anti-EGFR antibody 806 generates responses in murine de novo EGFR mutant-dependent lung carcinomas." J. Clin. Invest. (2007); 117(2): 346–352.

Lindmo, T., et al., "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess." J. Immunol. Methods, 1984. 72(1): p. 77-89.

Liu, Z., Panousis, C., Smyth, F.E., Murphy, R., Wirth, V., Cartwright, G., Johns, T.G., and Scott, A.M. "Generation of Anti-Idiotype Antibodies for Application in Clinical Immunotherapy Laboratory Analyses." Hybridoma and Hybridomics, (2003) 22 (4): 219- 228.

Luwor RB, Johns TG, Murone C, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "Monoclonal Antibody 806 Inhibits the Growth of Tumor Xenografts Expressing Either the DE2–7 or Amplified Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) but not Wild-Type EGFR." Cancer Research (2001) 61: 5355–5361.

Luwor, R.B., Zhu, H-J., Walker, F., Vitali A.A., Perera, R.M., Burgess, A.W., Scott, A.M. and Johns, T.G. "The Tumor Specific de2-7 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) confers Increased survival in BaF/3 Cells Via a PI-3 Kinase Dependent Mechanism." Oncogene (2004) 23: 6095-6104

MacDonald, A., Chisholm, G. D., and Habib, F. K. (1990) Br. J Cancer. 62,579-584.

Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. "Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." Cancer Res., 44 : 1002-1007, 1984.

Mellinghoff, I. K., Cloughesy, T. F., and Mischel, P. S. (2007) Clin. Cancer Res. 13,378-381.

Mendelsohn, J. "Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. Clin. Cancer Res." 3:2703-2707,1997.

Mickey, D. D., Stone, K. R., Wunderli, H., Mickey, G. H., Vollmer, R. T., and Paulson, D. F. (1977) Cancer Res. 37,4049-4058.

Mineo C, Gill GN, Anderson RG. "Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae." J. Biol. Chem. 1999; 274: 30636-43.

Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji X, Suvarna P, Voland JR, Old LJ, H-J. Su Huang, Cavenee WK. "Growth Suppression of Intracranial Xenografted Glioblastomas Overexpressing Mutant Epidermal Growth Factor Receptors by Systemic Administration of Monoclonal Antibody (mAb) 806, a

Novel Monoclonal Antibody Directed to the Receptor." Cancer Research (2001) 61: 5349–5354.

Mishima, K. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion *in vivo*." Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 40 : 519,1999.

Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 8484-8489, 2000.

Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors." Cancer Res., 55 : 5536-5539,1995.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Acta crystallographica 53, 240-255.

Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. "A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis." Cancer Res. 56 : 5079-86,1996.

Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 : 5724-5729, 1998.

Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications." Cancer Lett., 162 (Suppl. 1):S17-S21, 2001.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974) Journal of bacteriology 119, 736-747.

Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:7727-7731, 1994.

Ogiso, H., Ishitani, R, Nureki, 0., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, 1. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) Cell 20; 110, 775-787.

Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. "Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor." Br. J. Cancer 1996; 73: 1366-72.

Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. "Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer." Br. J. Cancer. 82 : 186-94, 2000.

Old, L. J. "Immunotherapy for cancer." Sci. Am., 275 : 102-109,1996.

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Academic Press (New York).

Padlan EA. "A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties." Mol. Immunol. 1991 28(4-5):489-98.

Padlan et al., EP 519596, Merck/NIH

Palacios, R, Henson, G., Steinmetz, M., and McKeam, J. P. (1984) Nature. 309, 126-131.

Panousis, C., Rayzman, V.M., Johns, T.G., Renner C., Liu Z., Cartwright, G., Lee F-T., Wang, D., Gan, H., Cao, D., Kypridis, A., Smyth, F.E., Brechbiel, M.W., Burgess, A.W., Old, L.J. and Scott, A.M. "Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR." Br. J. Cancer (2005) 92:1069-1077.

PCT Patent WO02092771, 2002.

Perera R.M., Narita Y., Furnari, F.B., Luwor, R.B., Burgess, A.W., Old, L.J., Cavenee, W.K., Scott, A.M. and Johns, T.G. "A novel EGFR antibody that displays synergistic anti-tumor activity when combined with conventional EGFR therapeutics." Clinical Cancer Research (2005) 11: 6390-6399.

Perera R.M., Zoncu R., Johns T.G., Pypaert M., Lee F.T., Mellman I., Old L.J., Toomre D.K., and Scott A.M. "Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody." Neoplasia. (2007); 9(12):1099-110

Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos, C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., et al. "Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated by monoclonal antibody RG 83852." J. Clin. Oncol., 12 : 730-739, 1994.

Pietras, R. J., Pegam, M. D-, Finn, R-S., Maneval, D. A., and Slmon, D. J. "Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs." Oncogene, 17: 2235-2249, 1998.

Ponten J, Macintyre EH. "Long term culture of normal and neoplastic human glia." Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1968 ; 74: 465-86.

Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., and Geissler, F. "Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores." Cancer Res. 50 : 1243-50,1990.

Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. "*In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent." Nucl. Med. Biol. 1997; 24 : 639-47.

Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts." Cancer Res., 55 : 4375-4382,1995.

Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate." Cancer Res. 57: 1510-5,1997.

Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "*In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent." Nucl. Med. Biol. 24 : 63947, 1997.

Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate." Cancer Res. 56 : 4970-7, 1996.

Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z., and Koprowski, H. "Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects." Cancer Res., 47: 3692-3696, 1987.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Crit. Rev. Oncol. Hematol., 19 : 183-232, 1995.

Sampson, J. H, Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., : Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D, "Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 7503-7508, 2000.

Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., and Gill, G. N. "Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice." Cancer Res. 46 : 4701-5, 1986.

Sato, J. D., Le, A. D., and Kawamoto, T. "Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors." Methods Enzymol. 146 : 63-81, 1987.

Schlessinger, J. (2002) Cell 20; 110,669-672.

Scott A.M., Gill S. S., Lee F., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T., Chappell B., Papenfuss A., Old L.J. "A Phase I single dose escalation trial of ch806 in

patients with advanced tumors expressing the 806 antigen." Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 24, No. 18S (June 20 Supplement), (2006): 13028.

Scott A.M., Lee FT., Tebbutt N., Herbertson R., Gill S.S., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T.H., Chappell B.,. Papenfuss A.T., Poon A.M.T., Hopkins W., Smyth F.E., MacGregor D., Cher L.M., Jungbluth A.A., Ritter, G., Brechbiel M.W., Murphy R., Burgess AW, Hoffman E.W., Johns T.J., Old L.J. "A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2007) 104 (10): 4071-6. Epub 2007 February 28.

Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapy. Curr. Opin. Immunol., 9: 717-722, 1997.

Seymour L. "Novel anti-cancer agents in development : exciting prospects and new challenges." Cancer Treat. Rev. 1999; 25: 301-12.

Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) Mol. Cell Bio. 11,4005-4014.

Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) Mol. Biol. Cell 3, 1235-1243.

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and Press, M. F. "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science (Wash. DC). 244 : 707-712,1989.

Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." Semin. Oncol., 26 (Suppl. 12) : 60-70,1999.

Sok, J. c., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. 1., Freilino, M. 1., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., and Grandis, J. R. (2006) Clin. Cancer Res. 12,5064-5073.

Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. (2002) J. Biol.. Chem. 277,46265-46272.

Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., and Schantz, S. P. "Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and

differentiation of head and neck cancer." Otolaryngol. Head Neck Surg. 111 : 633-43,1994.

Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 8602-8606, 1990.

Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. "Epidermal growth factor receptor in enhances tumorigenicity in human breast cancer." Cancer Res., 60 : 3081-3087, 2000.

Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., and Asano, G. "Inhibitory effect of antiepidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer." Cancer (Phila.), 77 : 1639-1645, 1996.

Todaro, G. J., Delarco, J. E., and Cohen, S. (1976) Nature 264, 26-31.

Trail, P. A., and Bianchi, A. B. "Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer." Curr. Opin. Immunol., 11: 584-588, 1999.

Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994)."Internal image anti-idiotype antibodies related to renal- cell carcinoma-associated antigen G250." Int. J. Cancer 56 (4): 609-14.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and. (1984) Nature. 309,418-425.

Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) J. Appl. Cryst. 30, 1022-1025.

van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuijsen, M. M. (1994) J. Immunol. Methods. 174,311-320.

Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials." Ann. Oncol., 8 : 1197-1206,1997.

Wade, J. D., Hojo, K., Kawasaki, K., Johns, T. G., Catimel, B., Rothacker, J., and Nice, E. C. (2006) Anal. Biochem. 348, 315-317.

Waksal, H. W. "Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer." Cancer Metastasis Rev., 18 : 427-436, 1999.

Walker, F., Orchard, S. G., Jorissen, R N., Hall, N. E., Zhang, H. H., Hoyne, P. A., Adams, T. E., Johns, T. G., Ward, C., Garrett, T. P., Zhu, H. 1., Nerrie, M., Scott, A. M., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2004) J. Biol. Chern. 79, 22387-22398.

Weiner, L. M. "An overview of monoclonal antibody therapy of cancer." Semin. Oncol., 26 (Suppl. 12) : 41-50,1999.

Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., Mellstedt, H., and Boethius, J. "Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma." Cancer Immunol. Immunother., 44 : 157-164,1997.

Whitson K.B., Red M.L., Whitson S.R., McCoy A., Vitali A.A., Walker F., Johns T.G., Beth A.H. and Staros J.A. "Functional Effects of Selective Glycosylation at Asn-579 of the Epidermal Growth Factor Receptor." Biochemistry (2005) 44: 14920-14931.

Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., and Bigner, D. D. "Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches." Cancer Metastasis Rev., 18 : 451-464, 1999.

Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., et al. "Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas." Cancer Res.55 : 3140-3148, 1995.

Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. "Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII." Cancer Res. 57 : 4130-40, 1997.

Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bier, D. D. "The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target." J. Neurovirol., 4: 148-158, 1998.

Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 2965-2969,1992.

Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. "Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors." Mol. Cell Biol. 1988; 8:1816-20.

Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. "A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors." Jpn. J. Cancer Res. 1990; 81 : 773-9.

Yarden, Y. and Schlessinger, J. (1987) Biochemistry. 26, 1443-1451.

Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) Nat. Rev. Mol. Cell BioI. 2, 127-137.

Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z. R., Xiao, D., Wang, T., Al Moustafa, A. E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N. E., Pages, G., and Alaoui-Jamali, M. A. (2002) Mol. Biol. Cell. 13(11):4029-44.

Ymer, S., Tucker, W. Q., Sanderson, C. 1., Hapel, A. J., Campbell, H. D., and Young, 1. G. (1985) Nature. 19-25;317,255-258.

Zhang, x., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) Cell. 125, 1137-1149.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, & Yokoyama S (2003) Mol. Cell. 12:541-552.

Ferguson KM (2008) Annu. Rev. Biophys. 37, 353-373.

Mendelsohn J & Baselga J (2006) Semin. Oncol. 33, 369-385.

Herbst RS, Kim ES, & Harari PM (2001) Expert Opin. Biol. Ther. 1, 719-732.

Lynch DH & Yang XD (2002) Semin. Oncol. 29, 47-50.

Baselga J & Arteaga CL (2005) J. Clin. Oncol. 23, 2445-2459.

Burgess AW (2008) Growth Factors 26, 263-274.

Milano G, Spano JP, & Leyland-Jones B (2008) Br. J. Cancer 99, 1-5.

Solomon BM & Jatoi A (2008) Curr. Oncol. Rep. 10, 304-308.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, & Huang HJ (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 7727-7731.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, & Bigner DD (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4207-4211.

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) Int. J. Cancer. 98, 398-408.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 639-644.

Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, Skrinos E, Murone C, Saunder TH, Chappell B, et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 4071-4076.

Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 15871-15876.

Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Gan HK, Murone C, Ahlkvist M, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, et al. (2005) Clin. Cancer. Res. 11, 6390-6399.

Johns TG, Adams TE, Cochran JR, Hall NE, Hoyne PA, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, Walker F, et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375-30384.

Walker F, Orchard SG, Jorissen RN, Hall NE, Zhang HH, Hoyne PA, Adams TE, Johns TG, Ward C, Garrett TP, et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 22387-22398.

Sivasubramanian A, Chao G, Pressler HM, Wittrup KD, & Gray JJ (2006) Structure 14, 401-414.

Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, & Scott AM (2001) Cancer Res. 61, 5355-5361.

Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D'Cunha R, Jason M, & Dodd JG (1993) Mol. Cell Biochem. 126, 151-158.

Sizeland AM & Burgess AW (1991) Mol. Cell Biol. 11, 4005-4014.

Chao G, Cochran JR, & Wittrup KD (2004) J. Mol Biol. 342, 539-550.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, et al. (2002) Cell 110, 763-773.

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, & Ferguson KM (2005) Cancer Cell. 7, 301-311.

Hogg PJ (2003) Trends Biochem. Sci. 28, 210-214.

Li S, Kussie P, & Ferguson KM (2008) Structure 16, 216-227.

Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knochel T, & Ferguson KM (2008) Cancer Cell 13, 365-373.

Sandler AB (2006) Oncology (Williston Park) 20, 35-40.

Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ, Hale LP, Small C, Dranoff G, Friedman AH, et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 7503-7508.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, & Schlessinger J (1984) Nature. 309, 418-425.

Walker F, Hibbs ML, Zhang HH, Gonez LJ, & Burgess AW (1998) Growth Factors 16, 53-67.

Wade JD, Hojo K, Kawasaki K, Johns TG, Catimel B, Rothacker J, & Nice EC (2006) Anal. Biochem. 348, 315-317.

Vagin AA & Isupov MN (2001) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57, 1451-1456.

Murshudov GN, Vagin AA, & Dodson EJ (1997) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 53, 240-255.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, & Lemmon MA (2003) Mol. Cell 11, 507-517.

Rettig WJ, Old LJ (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:481-511.

Van den Eynde BJ, Scott AM (1998) in Encyclopedia of Immunology, eds Roitt DPJ, Roitt IM (Academic Press: London), pp 2424-2431.

Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, et al. (1997) Blood 90(6):2188-2195.

Baselga J, Artega CL (2005) J. Clin. Oncol. 23:2445-2449.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997) Ann. Oncol. 8(12): 1197-206.

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, et al. (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744.

Welt S, Divgi CR, Real FX, Yeh SD, Garin-Chesa P, Finstad CL, Sakamoto J, Cohen A, Sigurdson ER, Kemeny N, et al. (1990) J. Clin. Oncol. 8(11):1894-906.

Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon J, Hannah A, U P, Rigopolous A, Sturrock S, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11(13):4810-4817.

Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Oosterhof GO, Witjes JA, Koenders EB, Oyen WJ, Buijs WC, Debruyne FM, Corstens FH, et al. (1997) J. Clin. Oncol. 15:1529-1537.

Scott AM, Geleick D, Rubira M, Clarke K, Nice EC, Smyth FE, Stockert E, Richards EC, Carr FJ, Harris WJ, et al. (2000) Cancer Res 60:3254-3261.

Scott AM, Lee F-T, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, et al. (2001) J. Clin. Oncol. 19(19):3976-3987.

Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohen A, Larson SM, Old LJ (1994) J. Clin. Oncol. 12:1193-1203.

Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:1639-47.

Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA. 87(21):8602-8606.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6899-6903.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(16):7727-7731.

Hills D, Rowlinson-Busza D, Gullick WJ (1995) Int. J. Cancer 63(4):537-543.

Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA (2003) Lancet Oncol. 4(7):397-406.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) Clin. Cancer Res. 1(11):1311-1318.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(11):4207-4211.

Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtness B, Bos M, D'Andrea G, Seidman A, Norton L, Gunnett K, et al. (2000) J. Clin. Oncol. 18(4):904-914.

Graeven U, Kremer B, Sudhoff T, Kiling B, Rojo F, Weber D, Tillner J, Unal C, Schmiegel W (2006) Br. J. Cancer 94(9):1293-1299.

Ramos TC, Figueredo J, Catala M, Gonzales S, Selva JC, Cruz TM, Toldeo C, Silva S, Pestano Y, Ramos M, et al. (2006) Cancer Biol. Ther. 5(4):375-379.

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) Int. J. Cancer 98(3):398-408.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TG, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2): 639-644.

Johns TG, Adams TE, Wittrup KD, Hall NE, Hoyne PA, Cochrane JR, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384.

Johns TG, Mellman I, Cartwright GA, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2005) FASEB J. 19(7):780-782.

Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2001) Cancer Res. 61(14): p. 5355-5361.

Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(26):15871-15876.

Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji XD, Suvarna P, Voland JR, Old LJ, et al. (2001) Cancer Res. 61(14):5349-5354.

Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Tavernasi ML, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, Old LJ, Cavenee WK, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11(17):6390-6399.

Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, Renner C, Liu Z, Cartwright G, Lee F-T, Wang D, Kypridis A, Smyth FE, et al. (2005) Br. J. Cancer. 92(6):1069-1077.

Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM, et al. (1991) J. Natl. Cancer Inst. 83(2):97-104.

Baselga J (2001) Eur. J. Cancer 37 Suppl 4:S16-22.

Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A (2006) Clin. Colorectal Cancer 6(1):29-31.

Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, Bukowski R, Haas N, Lockbaum P, Li YP, et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:3003-3015.

Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, Doroshow JH, Polpin EA, Goodin S, Mauro D, Rubin EH (2006) Clin. Cancer Res. 12(21): 6517-6522.

Lacouture AE (2006) Nature Rev. Cancer. 6:803-812.

Adams GP, Weiner LM (2005) Nat. Biotechnol. 23(9): 1147-1157.

Liu Z, Panousis C, Smyth FE, Murphy R, Wirth V, Cartwright G, Johns TG, Scott AM (2003) Hybrid Hybridomics 22(4):219-28.

Stabin MG, Sparks RB, Crowe E (2005) J. Nucl. Med. 46(6):1023-1027.

Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr, Richards EC, Old LJ, Welt S (2001) Cancer Res. 61(18):685-6859.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập được kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu mô (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR), trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 164, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 166.

2. Kháng thể phân lập được theo điểm 1, trong đó đầu C của vùng biến đổi của chuỗi nặng được gắn với vùng ổn định trên chuỗi nặng isotyp IgG.

3. Kháng thể phân lập được theo điểm 2, trong đó isotyp IgG là isotyp IgG1.

4. Kháng thể phân lập được theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó đầu C của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được gắn với vùng ổn định trên chuỗi nhẹ kapa.

5. Kháng thể phân lập được theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng ổn định của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

6. Kháng thể phân lập được theo điểm 1 hoặc 5, trong đó kháng thể này bao gồm vùng ổn định của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48.

7. Kháng thể phân lập được theo điểm 1, trong đó kháng thể này là dạng kháng thể F(ab')2, mảnh scFv, diabody, triabody hoặc tetrabody.

8. Kháng thể phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này còn chứa chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc chất đánh dấu chức năng.

9. Kháng thể phân lập được theo điểm 8, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc chất đánh dấu chức năng này là dược chất được liên kết đồng hóa trị.

10. Kháng thể phân lập được theo điểm 8, trong đó chất đánh dấu chức năng đã nêu là dược chất gây độc tế bào.

11. Kháng thể phân lập được theo điểm 8, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được đã nêu là chất đánh dấu phóng xạ.

12. Kháng thể phân lập được theo điểm 11, trong đó chất đánh dấu phóng xạ được chọn từ nhóm bao gồm ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{121}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In, ^{211}At, ^{198}Au, ^{67}Cu, ^{225}Ac, ^{213}Bi, ^{99}Tc và ^{186}Re.

13. Kháng thể phân lập được theo điểm 8, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được là chất hiện hình ảnh.

14. Kháng thể phân lập được theo điểm 13, trong đó chất hiện hình ảnh này là chất tăng cường hiện hình ảnh cộng hưởng từ.

15. Kháng thể phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó kháng thể này được pegyl hóa.

16. Kit dùng để chẩn đoán khối u mà EGFR được biểu hiện bất thường hoặc EGFR được biểu hiện ở dạng protein bị cắt cụt, trong đó kit này chứa kháng thể phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15 và, tùy ý, còn chứa các thuốc thử và/hoặc hướng dẫn sử dụng.

17. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

18. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó dược phẩm này còn chứa chất chống ung thư được chọn từ nhóm bao gồm chất hóa trị liệu, kháng thể kháng EGFR, các chất phóng xạ miễn dịch trị liệu và hỗn hợp của chúng.

19. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó chất hóa trị liệu được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế enzym tyrosin kinaza, chất ức chế quá trình phosphoryl hóa, chất điều hòa sau dịch mã, chất ức chế sự phát triển hoặc phân chia tế bào, chất ức chế gián phân, chất ức chế sự dẫn truyền tín hiệu và hỗn hợp của chúng.

20. Vật chủ đơn bào được biến nạp bằng phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa kháng thể phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó vật chủ đơn bào này tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm tế bào *E.coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces*, nấm men, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, Rl.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 và BMT10, tế bào thực vật, tế bào côn trùng và tế bào của người trong môi trường nuôi cấy mô.

21. Thể tiếp hợp miễn dịch, trong đó thể tiếp hợp miễn dịch này chứa chất gây độc tế bào và kháng thể phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

22. Axit nucleic phân lập được chứa trình tự mã hóa kháng thể phân lập được theo điểm 1.

23. Phương pháp sản xuất kháng thể phân lập được theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước biểu hiện axit nucleic trong điều kiện để biểu hiện kháng thể này, và bước thu hồi kháng thể này.

24. Thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng EGFR theo điểm 1 được dung hợp với chất gây độc tế bào, trong đó kháng thể này là isotyp IgG.

25. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 24, trong đó kháng thể này là bao gồm vùng ổn định trên chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 48.

26. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 24 hoặc 25, trong đó kháng thể này là isotyp IgG1.

27. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 26, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nhẹ kapa.

28. Dược phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 27 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ludwig Institute for Cancer Research

<120> Kháng thể phân lập được kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu mô, kit và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 9662WO02

<150> US 12/388,504

<151> 18/02/2009

<160> 195

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 402

<212> ADN

<213> Chuột nhắt

<400> 1

atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtgtcct gtctgatgtg 60

cagcttcagg agtcgggacc tagcctggtg aaaccttctc agtctctgtc cctcacctgc 120

actgtcactg gctactcaat caccagtgat tttgcctgga actggatccg gcagtttcca 180

ggaaacaagc tggagtggat gggctacata agttatagtg gtaacactag gtacaaccca 240

tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatcca agaaccaatt cttcctgcag 300

ttgaattctg tgactattga ggacacagcc acatattact gtgtaacggc gggacgcggg 360

tttccttatt ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 402

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<400> 2

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45

Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110
Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ala
130

<210> 3
<211> 384
<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 3
atggtgtcca cagctcagtt ccttgcattc ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt 60
gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 180
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300
gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 384

<210> 4
<211> 128
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala
100 105 110
Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> được biotin hóa tại vị trí 1

<400> 5
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> được biotin hóa tại vị trí 13

<400> 6
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

<210> 7
<211> 6149
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vectơ tổng hợp

<400> 7
ctcgagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 60

ccaggcttta cactttatgc tcccggctcg tatgttgtgt ggagattgtg agcggataac 120
aatttcacac agaattcgtg aggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc 180
acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg 240
cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttttcc cgagggtggg 300
ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc 360
gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat 420
ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc 480
cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc 540
gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg 600
gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg 660
acctgctgcg acgcttttt tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca 720
cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac 780
atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca 840
agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc 900
ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc 960
tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc 1020
cacacaaagg aaaagggcct ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta 1080
ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg 1140
ttgggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt 1200
taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc 1260
ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgta 1320
cgcgtctcgg gaagctttag tttaaacgcc gccaccatgg tgtccacagc tcagttcctt 1380
gcattcttgt tgctttggtt tccaggtgca agatgtgaca tcctgatgac ccaatctcca 1440
tcctccatgt ctgtatctct gggagacaca gtcagcatca cttgccattc aagtcaggac 1500
attaacagta atatagggtg gttgcagcag agaccaggga aatcatttaa gggcctgatc 1560
tatcatggaa ccaacttgga cgatgaagtt ccatcaaggt tcagtggcag tggatctgga 1620
gccgattatt ctctcaccat cagcagcctg gaatctgaag attttgcaga ctattactgt 1680
gtacagcatg ctcagtttcc gtggacgttc ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacgg 1740
gtgagtggat ccatctggga taagcatgct gttttctgtc tgtccctaac atgccctgtg 1800
attatgcgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta cttaaacacc atcctgtttg 1860
cttctttcct caggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag 1920
cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta tcccagagag 1980
gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc 2040
acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa 2100
gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 2160
cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttgagcta gaactaacta actaagctag 2220
caacggtttc cctctagcgg gatcaattcc gccccccccc cctaacgtta ctggccgaag 2280
ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc 2340
ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg 2400
tctttcccct ctcgccaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc 2460
tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc 2520

cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa 2580
ggcggcacaa ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct 2640
ctcctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg 2700
atctgatctg gggcctcggt gcacatgctt tacgtgtgtt tagtcgaggt taaaaaacgt 2760
ctaggccccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgata ataccatggt 2820
tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta 2880
tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca 2940
ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga 3000
cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga 3060
cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct 3120
cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 3180
gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga 3240
gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 3300
tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga 3360
ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg 3420
cttttctgga ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc 3480
gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt 3540
gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga 3600
gttcttctga gtcgatcgac ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 3660
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg 3720
gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct 3780
cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta 3840
aatcgggggc tcccttttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa 3900
cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgcctt 3960
tgacgttgga gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca 4020
accctatctc ggtctattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 4080
agctgattta acaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttaggt 4140
ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatatttg tttatttttc taaatacatt 4200
caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 4260
ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 4320
gccttactgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 4380
tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt 4440
ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg 4500
tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 4560
atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatat tacggatggc atgacagtaa 4620
gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga 4680
caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 4740
ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 4800
ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta 4860
ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 4920
ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc 4980

gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 5040
ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga 5100
taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt 5160
agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5220
atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 5280
aaaagatcaa aggatgttct tgagatcctt tttttctgca cgtaatctgc tgcttgcaaa 5340
caaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt 5400
tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 5460
gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat 5520
cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag 5580
acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 5640
cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag 5700
cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac 5760
aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 5820
gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 5880
atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc 5940
tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 6000
gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga 6060
agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg 6120
caggtatcac gaggcccttt cgtcttcac 6149

<210> 8
<211> 6625
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vectơ tổng hợp

<400> 8
ctcgagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 60
ccaggcttta cactttatgc tcccggctcg tatgttgtgt ggagattgtg agcggataac 120
aatttcacac agaattcgtg aggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc 180
acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg 240
cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttcc cgagggtggg 300
ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc 360
gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat 420
ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc 480
cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccccttc 540
gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg 600
gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg 660

acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca 720
cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac 780
atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca 840
agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc 900
ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc 960
tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc 1020
cacacaaagg aaaagggcct ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta 1080
ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg 1140
ttgggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt 1200
taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc 1260
ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgta 1320
cgcgtctcgg gaagctttag tttaaacgcc gccaccatga gagtgctgat tcttttgtgg 1380
ctgttcacag cctttcctgg tgtcctgtct gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc 1440
ctggtgaaac cttctcagac tctgtccctc acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc 1500
agtgattttg cctggaactg gatccggcag tttccaggaa acaagctgga gtggatgggc 1560
tacataagtt atagtggtaa cactaggtac aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc 1620
actcgagaca catccaagaa ccaattcttc ctgcagttga attctgtgac tattgaggac 1680
acagccacat attactgtgt aacggcggga cgcgggtttc cttattgggg ccaagggact 1740
ctggtcactg tctctgcaca gtgagtggat cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac 1800
accgcggtca catggcacca cctctcttgc agcctccacc aagggcccat cggtcttccc 1860
cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctggtcaa 1920
ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt 1980
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac 2040
cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag 2100
caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc 2160
accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc 2220
caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag 2280
ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataacgc 2340
caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtcctcac 2400
cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc 2460
cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca 2520
ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg 2580
cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc 2640
ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta 2700
cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt 2760
gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa 2820
atgagctaga aactaactaa gctagcaacg gtttccctct agcgggatca attccgcccc 2880
ccccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata 2940
tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg 3000
tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 3060
tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 3120

cgacccttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3180
cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga 3240
tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3300
cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacgt 3360
gtgtttagtc gaggttaaaa aacgtctagg ccccccgaac cacggggacg tggttttcct 3420
ttgaaaaaca cgataatacc atggttcgac cattgaactg catcgtcgcc gtgtcccaaa 3480
atatggggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc gctcaggaac gagttcaagt 3540
acttccaaag aatgaccaca acctcttcag tggaaggtaa acagaatctg gtgattatgg 3600
gtaggaaaac ctggttctcc attcctgaga agaatcgacc tttaaaggac agaattaatg 3660
gttcgatata gttctcagta gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc 3720
caaaagtttg gatgatgcct taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga 3780
catggtttgg atagtcggag gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca 3840
cctcagactc tttgtgacaa ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga 3900
aattgatttg gggaaatata aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca 3960
ggaggaaaaa ggcatcaagt ataagtttga agtctacgag aagaaagact aacaggaaga 4020
tgctttcaag ttctctgctc ccctcctaaa gctatgcatt tttataagac catgggactt 4080
ttgctggtcg atcgacctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac 4140
agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 4200
gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 4260
tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc 4320
gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 4380
attagggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt cgcctttgac 4440
gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc 4500
tatctcggtc tatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct 4560
gatttaacaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca 4620
cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa 4680
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 4740
gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct 4800
tactgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 4860
tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg 4920
ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt 4980
atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga 5040
cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatattacg gatggcatga cagtaagaga 5100
attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac 5160
gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg 5220
ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 5280
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct 5340
agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 5400
gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 5460
gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat 5520
ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 5580

tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat 5640
tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct 5700
catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 5760
gatcaaagga tgttcttgag atccttttttt tctgcacgta atctgctgct tgcaaacaaa 5820
aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg 5880
aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag 5940
ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg 6000
ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga 6060
tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 6120
ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 6180
acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 6240
gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt 6300
cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg 6360
aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac 6420
atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 6480
gctgataccg ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg 6540
gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagg 6600
tatcacgagg ccctttcgtc ttcac 6625

<210> 9
<211> 234
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vectơ tổng hợp

<400> 9
Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
20 25 30
Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
50 55 60
Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala

```
            100                 105                 110
Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 10
<211> 463
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> vectơ tổng hợp

<400> 10

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

```
Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125
Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
    130                 135                 140
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145                 150                 155                 160
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
                165                 170                 175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
            180                 185                 190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Tyr Ser Val Pro Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
    210                 215                 220
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225                 230                 235                 240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
                245                 250                 255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
            260                 265                 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
        275                 280                 285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    290                 295                 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305                 310                 315                 320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                325                 330                 335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
            340                 345                 350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
        355                 360                 365
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    370                 375                 380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385                 390                 395                 400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                405                 410                 415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
            420                 425                 430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
```

```
        435                 440                 445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455                 460
```

<210> 11
<211> 116
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 11

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

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 12

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

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 13
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 14
Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
1 5 10 15

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 15
Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5

<210> 16

<211> 16
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 16
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 17
Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 18
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 19
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 20

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 21
<211> 348
<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 21
gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgactatg cctggaactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagtt acagtgctaa cactaggtac 180
aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
cgcgggtttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 22
<211> 116
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 22
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ala
115

<210> 23
<211> 6

<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 23
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 24
Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 25
Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 26
<211> 324
<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 26
gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctctat ctctgggaga cacagtcagt 60
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
gaagattttg tagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 27
<211> 108
<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<400> 27

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

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 28

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 29

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 30
Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 31
<211> 348
<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 31
gatgtgcagc ttcaggggtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagct acagtggtaa cactagatac 180
aacccatctc tcagaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
cgcggatttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 32
<211> 116
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 32
Asp Val Gln Leu Gln Gly Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Arg Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ala
115

<210> 33

<211> 6
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 33
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 34
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 35
Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 36
<211> 322
<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 36
gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtgt ctctgggaga cacagtcaac 60
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
gaggattttg cagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa ac 322

<210> 37
<211> 108

<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 37
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Val Asn Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45
Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 38
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 39
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 40

<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 40
Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 41
<211> 11891
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vecto tổng hợp

<400> 41
aagcttgccg ccaccatgga ttggacctgg cgcattctct ttctggtagc agccgccaca 60
ggtaaggggc tgccaaatcc cagtgaggag gaagggatcg aaggtcacca tcgaagccag 120
tcacccagtg aaggggggctt ccatccactc ctgtgtcttc tctacaggtg tccacagcca 180
ggtgcagctc caagagagtg gacctgggct tgtcaagccg agtcaaactt tgtccctaac 240
atgtactgtg tccggatact ctatctcatc agattttgcg tggaattgga taaggcagcc 300
accagggaaa ggtttagaat ggatgggcta catatcatac tctgggaaca ccagatatca 360
accttctctg aaaagccgga tcacaatctc aagggacacg tcgaagaatc agttcttcct 420
gaaactgaac tccgttacag ccgcagacac agcaacatat tactgcgtaa ccgctggcag 480
aggcttcccc tattggggac agggcaccct agtgacagtg agcagcggta agatggcaca 540
ccgtggccgg cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac accgcggtca catggcacct 600
tttctcttcc agcctccacc aagggcccca gcgtgttccc cctggccccc agcagcaaga 660
gcaccagcgg cggcacagcc gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg 720
tgaccgtgag ctggaacagc ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc 780
tgcagagcag cggcctgtac agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg 840
gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga 900
aggtggagcc caagagctgc gacaagaccc acacctgccc cccctgccca gccccagagc 960
tgctgggcgg accctccgtg ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca 1020
gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaggac ccagaggtga 1080
agttcaattg gtatgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag 1140
agcagtacaa cagcacctac agggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc 1200
tgaacggcaa ggaatacaaa tgcaaggtct ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaaa 1260
agaccatcag caaggccaag ggccagccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccccct 1320
cccgggacga gtgcaccaag aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc 1380
ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca 1440

cccccccagt gctggacagc gacggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca 1500
agagcaggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca 1560
accactacac ccagaagagc ctgagcctgt cccccggcaa gtgatgacga cgcggccgtg 1620
cggacgaccg aattcattga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc 1680
tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt 1740
tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 1800
cacaaataaa gcatttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt 1860
atcttatcat gtctggcggc cgccgatatt tgaaaatatg gcatattgaa aatgtcgccg 1920
atgtgagttt ctgtgtaact gatatcgcca tttttccaaa agtgattttt gggcatacgc 1980
gatatctggc gatagcgctt atatcgttta cgggggatgg cgatagacga ctttggtgac 2040
ttgggcgatt ctgtgtgtcg caaatatcgc agtttcgata taggtgacag acgatatgag 2100
gctatatcgc cgatagaggc gacatcaagc tggcacatgg ccaatgcata tcgatctata 2160
cattgaatca atattggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata 2220
ttggctattg gccattgcat acgttgtatc catatcataa tatgtacatt tatattggct 2280
catgtccaac attaccgcca tgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa 2340
ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 2400
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 2460
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 2520
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 2580
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 2640
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc 2700
agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca 2760
ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta 2820
acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa 2880
gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc 2940
tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc 3000
ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccacccccc 3060
tggcttctta tgcatgctat actgtttttg gcttggggtc tatacacccc cgcttcctca 3120
tgttataggt gatggtatag cttagcctat aggtgtgggt tattgaccat tattgaccac 3180
tcccctattg gtgacgatac tttccattac taatccataa catggctctt tgccacaact 3240
ctctttattg gctatatgcc aatacactgt ccttcagaga ctgacacgga ctctgtattt 3300
ttacaggatg gggtctcatt tattatttac aaattcacat atacaacacc accgtcccca 3360
gtgcccgcag tttttattaa acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt 3420
ccggacatgg gctcttctcc ggtagcggcg gagcttctac atccgagccc tgctcccatg 3480
cctccagcga ctcatggtcg ctcggcagct ccttgctcct aacagtggag gccagactta 3540
ggcacagcac gatgcccacc accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtagggtatg 3600
tgtctgaaaa tgagctcggg gagcgggctt gcaccgctga cgcatttgga agacttaagg 3660
cagcggcaga agaagatgca ggcagctgag ttgttgtgtt ctgataagag tcagaggtaa 3720
ctcccgttgc ggtgctgtta acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcgttgctg 3780
ccgcgcgcgc caccagacat aatagctgac agactaacag actgttcctt tccatgggtc 3840
ttttctgcag tcaccgtcct tgacacgaag cttgccgcca ccatggattg gacttggaga 3900

atactgtttc ttgtagcagc cgcaacaggt aaggggctgc caaatcccag tgaggaggaa 3960
gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca agggggcgga ccgcttccat ccactcctgt 4020
gtcttctcta caggtgttca cagtgatatt cagatgactc agagtccatc cagcatgtca 4080
gtctccgtgg gagatagggt gacgataacc tgtcattcaa gccaagacat caactccaat 4140
attggatggc tccaacagaa gcctggtaag tccttcaaag gactaatcta tcacggaaca 4200
aacttggacg acggcgtgcc atcgagattt tcagggtctg gcagcgggac cgactataca 4260
ctgaccatct ctagcttaca accagaggac tttgccacat actactgcgt ccagtacgct 4320
cagttcccct ggacattcgg cggcggcaca aaactggaaa tcaaacgtga gtagcggtcc 4380
gttaattaaa gatccttcta aactctgagg gggtcggatg acgtggccat tgttacttaa 4440
acaccatcct gtttgcttct ttcctcagga accgtcgcag ctccctccgt gttcatcttc 4500
cccccatccg acgagcaact gaagtcaggc acagcctccg tggtgtgcct ccttaataac 4560
ttttacccaa gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca acgcactaca gagcgggaac 4620
tctcaggaaa gcgtgacaga gcaggactca aaagattcaa catacagcct atcttctacc 4680
ctgacactgt caaaagctga ttatgaaaag cacaaagtat atgcctgtga agtaactcat 4740
cagggactca gcagccctgt cactaaaagt tttaatagag gcgaatgctg ataagcggcc 4800
gtgcggacga ccgaattcat tgatcataat cagccatacc acatttgtag aggttttact 4860
tgctttaaaa aacctcccac acctcccccc gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt 4920
tgttgttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 4980
tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 5040
tgtatcttat catgtctgga tcctctacgc cggacgcatc gtggccggca tcaccggcgc 5100
cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg 5160
ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg 5220
gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg 5280
cctcaaccta ctactgggct gcttcctaat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgacc 5340
tcgggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 5400
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 5460
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 5520
cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 5580
ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccgg ttcagcccga 5640
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc 5700
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 5760
agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 5820
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca 5880
aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 5940
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 6000
ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 6060
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 6120
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat 6180

agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 6240
cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa 6300

ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca 6360
gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 6420
cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 6480
cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 6540
ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 6600
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 6660
tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 6720
ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 6780
catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 6840
cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 6900
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac 6960
acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 7020
ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 7080
tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac 7140
attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctgatgg ctctttgcgg cacccatcgt 7200
tcgtaatgtt ccgtggcacc gaggacaacc ctcaagagaa aatgtaatca cactggctca 7260
ccttcgggtg ggcctttctg cgtttataag gagacacttt atgtttaaga aggttggtaa 7320
attccttgcg gctttggcag ccaagctaga tccggctgtg gaatgtgtgt cagttagggt 7380
gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt 7440
cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc 7500
atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc 7560
cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat ttttttatt tatgcagagg 7620
ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc 7680
taggcttttg caaaaagcta gcttggggcc accgctcaga gcaccttcca ccatggccac 7740
ctcagcaagt tcccacttga acaaaaacat caagcaaatg tacttgtgcc tgccccaggg 7800
tgagaaagtc caagccatgt atatctgggt tgatggtact ggagaaggac tgcgctgcaa 7860
aacccgcacc ctggactgtg agcccaagtg tgtagaagag ttacctgagt ggaattttga 7920
tggctctagt acctttcagt ctgagggctc caacagtgac atgtatctca gccctgttgc 7980
catgtttcgg gacccttcc gcagagatcc caacaagctg gtgttctgtg aagttttcaa 8040
gtacaaccgg aagcctgcag agaccaattt aaggcactcg tgtaaacgga taatggacat 8100
ggtgagcaac cagcacccct ggtttggaat ggaacaggag tatactctga tgggaacaga 8160
tgggcaccct tttggttggc cttccaatgg ctttcctggg ccccaaggtc cgtattactg 8220
tggtgtgggc gcagacaaag cctatggcag ggatatcgtg gaggctcact accgcgcctg 8280
cttgtatgct ggggtcaaga ttacaggaac aaatgctgag gtcatgcctg cccagtggga 8340
actccaaata ggaccctgtg aaggaatccg catgggagat catctctggg tggcccgttt 8400
catcttgcat cgagtatgtg aagactttgg ggtaatagca acctttgacc ccaagcccat 8460
tcctgggaac tggaatggtg caggctgcca taccaacttt agcaccaagg ccatgcggga 8520
ggagaatggt ctgaagcaca tcgaggaggc catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggta 8580
ccacattcga gcctacgatc ccaaggggg cctggacaat gcccgtggtc tgactgggtt 8640
ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc tgctggtgtc gccaatcgca gtgccagcat 8700
ccgcattccc cggactgtcg gccaggagaa gaaaggttac tttgaagacc gcggcccctc 8760

tgccaattgt gacccctttg cagtgacaga agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga 8820
gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa ctaattagac tttgagtgat cttgagcctt 8880
tcctagttca tcccaccccg ccccagagag atctttgtga aggaacctta cttctgtggt 8940
gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt 9000
ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc 9060
tatggaactg atgaatggga gcagtggtgg aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc 9120
tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct 9180
ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt 9240
ttgagtcatg ctgtgtttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta caccacaaag 9300
gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac ctttataagt 9360
aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag gcatagagtg 9420
tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat ttgtaaaggg 9480
gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca gccataccac 9540
atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca 9600
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 9660
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg 9720
tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc tagcttcgtg tcaaggacgg 9780
tgactgcagt gaataataaa atgtgtgttt gtccgaaata cgcgttttga gatttctgtc 9840
gccgactaaa ttcatgtcgc gcgatagtgg tgtttatcgc cgatagagat ggcgatattg 9900
gaaaaatcga tatttgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc gccgatgtga gtttctgtgt 9960
aactgatatc gccatttttc caaaagtgat ttttgggcat acgcgatatc tggcgatagc 10020
gcttatatcg tttacggggg atggcgatag acgactttgg tgacttgggc gattctgtgt 10080
gtcgcaaata tcgcagtttc gatataggtg acagacgata tgaggctata tcgccgatag 10140
aggcgacatc aagctggcac atggccaatg catatcgatc tatacattga atcaatattg 10200
gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc aatattggct attggccatt 10260
gcatacgttg tatccatatc ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caacattacc 10320
gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt 10380
tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg 10440
accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc 10500
aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc 10560
agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg 10620
gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat 10680
ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg 10740
tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag 10800
tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt 10860
gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt 10920
gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg 10980
ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga acgcggattc cccgtgccaa 11040
gagtgacgta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc cccttggctt cttatgcatg 11100
ctatactgtt tttggcttgg ggtctataca cccccgcttc ctcatgttat aggtgatggt 11160
atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga ccactcccct attggtgacg 11220

atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggctata 11280
tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct 11340
catttattat ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc cccagtgccc gcagtttta 11400
ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcgggtacg tgttccggac atgggctctt 11460
ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc catgcctcca gcgactcatg 11520
gtcgctcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc 11580
caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct 11640
cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga 11700
tgcaggcagc tgagttgttg tgttctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct 11760
gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag 11820
acataatagc tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg 11880
tccttgacac g 11891

<210> 42
<211> 135
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 42
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile
35 40 45
Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln
65 70 75 80
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95
Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110
Tyr Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 43
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 43

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 44
Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 45
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 46
Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 47
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 47
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
35 40 45
Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
50 55 60
Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln
100 105 110
Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 48

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

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 49
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 50
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 51
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 51
Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 52
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 52
gagaagcttg ccgccaccat ggattggacc tggcgcattc 40

<210> 53
<211> 79
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 53
cccttcctcc tcactgggat ttggcagccc cttacctgtg gcggctgcta ccagaaagag 60
aatgcgccag gtccaatcc 79

<210> 54
<211> 79
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 54
cccagtgagg aggaagggat cgaaggtcac catcgaagcc agtcaagggg gcttccatcc 60
actcctgtgt cttctctac 79

<210> 55
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 55
gactcggctt gacaagccca ggtccactct cttggagctg cacctggctg tggacacctg 60
tagagaagac acaggagtgg 80

<210> 56
<211> 84
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 56
gggcttgtca agccgagtca aactttgtcc ctaacatgta ctgtgtccgg atactctatc 60
tcatcagatt ttgcgtggaa ttgg 84

<210> 57
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 57
cccagagtat gatatgtagc ccatccattc taaacctttc cctggtggct gccttatcca 60
attccacgca aaatctgatg 80

<210> 58
<211> 79
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 58
gggctacata tcatactctg ggaacaccag atatcaaccc tctctgaaaa gccggatcac 60
aatcactagg gacacgtcg 79

<210> 59
<211> 83
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 59
gcagtaatat gttgctgtgt ctggggctgt aacggagttc agctgcagga agaactggct 60
cttcgacgtg tccctagtga ttg 83

<210> 60
<211> 81
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 60
ccagacacag caacatatta ctgcgtaacc gctggcagag gcttccccta ttggggacag 60
ggcaccctag tgacagtgag c 81

<210> 61
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 61
cacggatcca tcttaccgct gctcactgtc actagggtg 39

<210> 62
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 62
gagaagcttg ccgccaccat ggattg 26

<210> 63
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 63
ctgggatttg gcagcccctt acctgttgcg gctgctacaa gaaacagtat tctccaagtc 60
caatccatgg tggcggcaag 80

<210> 64
<211> 78
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 64
ggggctgcca aatcccagtg aggaggaagg gatcgaaggt gaccatcgaa gccagtcaag 60
ggggcttcca tccactcc 78

<210> 65
<211> 77
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 65
catgctggat ggactctgag tcatctgaat atcactgtga acacctgtag agaagacaca 60
ggagtggatg gaagccc 77

<210> 66
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 66
ctcagagtcc atccagcatg tcagtctccg tgggagatag ggtgacgata acctgtcatt 60
caagccaaga catcaactcc 80

<210> 67
<211> 82
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 67
gttccgtgat agattagtcc tttgaaggac ttaccaggct tctgttggag ccatccaata 60
ttggagttga tgtcttggct tg 82

<210> 68
<211> 84
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 68
caaaggacta atctatcacg gaacaaactt ggacgacggc gtgccatcga gattttcagg 60
gtctggcagc gggaccgact atac 84

<210> 69
<211> 76
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 69
gtgctggacg cagtagtatg tggcaaagtc ttctggctct aagctagaga tggtcagtgt 60
atagtcggtc ccgctg 76

<210> 70
<211> 79
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 70
catactactg cgtccagcac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc acaaaactgg 60
aaatcaaacg tgagtaggg 79

<210> 71
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 71
ctcggatccc tactcacgtt tgatttcc 28

<210> 72
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 72
gacggatcct tctaaactct gaggggtcg gatgacg 37

<210> 73
<211> 78
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 73
ggagctgcga cggttcctga ggaaagaagc aaacaggatg gtgtttaagt aacaatggcc 60
acgtcatccg acccccctc 78

<210> 74
<211> 78
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 74
ggaaccgtcg cagctccctc cgtgttcatc ttcccccccat ccgacgagca actgaagtca 60
ggcacagcct ccgtggtg 78

<210> 75
<211> 78
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 75
gtgcgttgtc cactttccac tggactttgg cctctcttgg gtaaaagtta ttaaggaggc 60
acaccacgga ggctgtgc 78

<210> 76
<211> 83
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 76
gtggaaagtg gacaacgcac tacagagcgg gaactctcag gaaagcgtga cagagcagga 60
ctcaaaagat tcaacataca gcc 83

<210> 77
<211> 88
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 77
cttcacaggc atataccttg tgcttttcat aatcagcttt tgacagtgtc agggtagaag 60
ataggctgta tgttgaatct tttgagtc 88

<210> 78
<211> 71
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 78
gcacaaggta tatgcctgtg aagtaactca tcagggactc agcagccctg tcactaaaag 60
ttttaataga g 71

<210> 79
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 79
cctgcggccg cttatcagca ttcgcctcta ttaaaacttt tggtgagagg g 51

<210> 80
<211> 1128
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 80
aagatggcac accgtggccg gcctctgcgc ctgggcccag ctctgtccca caccgcggtc 60
acatggcacc ttttctcttc cagcctccac caagggcccc agcgtgttcc ccctggcccc 120
cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc tgcctggtga aggactactt 180
ccccgagccc gtgaccgtga gctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt 240
ccccgccgtg ctgcagagca gcggcctgta cagcctgagc agcgtggtga ccgtgcccag 300
cagcagcctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa 360
ggtggacaag aaggtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc ccccctgccc 420
agccccagag ctgctgggcg gaccctccgt gttcctgttc ccccccaagc ccaaggacac 480
cctgatgatc agcaggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg gtggacgtga gccacgagga 540
cccagaggtg aagttcaatt ggtatgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa 600
gcccagagaa gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca 660
ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa atgcaaggtc tccaacaagg ccctgccagc 720
ccccatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac 780
cctgcccccc tcccgggacg agtgcaccaa gaaccaggtg tccctgacct gtctggtgaa 840
gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa 900
ctacaagacc acccccccag tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgt acagcaagct 960
gaccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga 1020
ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tcccccggca agtgatgacg 1080
acgcggccgt gcggacgacc gaattcattg atcataatca gccatacc 1128

<210> 81
<211> 465
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 81

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

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Cys Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460
Lys
465

<210> 82
<211> 209
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 82
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val

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

<210> 83
<211> 233
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 83

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1               5                   10                  15
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
            20                  25                  30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
        35                  40                  45
```

```
Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
    50                  55                  60
Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
65                  70                  75                  80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
                85                  90                  95
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln
            100                 105                 110
Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
        115                 120                 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
    130                 135                 140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145                 150                 155                 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                165                 170                 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            180                 185                 190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        195                 200                 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    210                 215                 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 84
Cys Val Gln His Ala Gln Phe
1 5

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 85
Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe

1 5

<210> 86
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 86
ccacatacta ctgcgtccag tacgctcagt tcccctggac 40

<210> 87
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 87
ctggacgcag tagtatgtgg 20

<210> 88
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 88
gagaagcttg ccgccaccat ggattg 26

<210> 89
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mồi tổng hợp

<400> 89
cactgggtga ctggcttcga tggtgacc 28

<210> 90
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 90
ggtcaccatc gaagccagtc acccagtgaa gggggcttcc atccactcc 49

<210> 91
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 91
ccaagatctg gccggccacg gtgtgccatc ttaccgctgc tcac 44

<210> 92
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 92
gagaagcttg ccgccaccat gg 22
<210> 93
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 93
cggtccgccc ccttgactgg cttcg 25

<210> 94
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 94
cgaagccagt caaggggcg gaccgcttcc atccactcct gtgtc 45

<210> 95
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 95
ccaagatctt taattaacgg accgctactc acgtttgatt tccagttttg 50

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 96
Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 97
Ser Val Thr Ala Pro Asp Thr
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 98
Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
1 5

<210> 99
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 99
ctgcagctga actccgttac agccgcagac acagcaacat attactgcg 49

<210> 100
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 100

cgcagtaata tgttgctgtg tctgcggctg taacggagtt cagctgcag 49

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 101
Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Phe Leu Gln
1 5 10

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 102
Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys
1 5 10

<210> 103
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 103
ggtcaccatc gaagccagtc acccagtgaa gggggcttcc atccactcc 49

<210> 104
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 104
gattcttcga cgtgtccctt gagattgtga tccggctttt cagag 45

<210> 105
<211> 55
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 105
caagggacac gtcgaagaat cagttcttcc tgaaactgaa ctccgttaca gccgc 55

<210> 106
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 106
ccaagatctg gccggccacg gtgtgccatc ttaccgctgc tcac 44

<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 107
Ser Ser Leu Glu Pro Glu
1 5

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 108
Ser Ser Leu Gln Pro Glu
1 5

<210> 109
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 109
cgaagccagt caaggggcg gaccgcttcc atccactcct gtgtc 45

<210> 110
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 110
ctctggttgt aagctagaga tggtcagtgt atag 34
<210> 111
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 111
ccatctctag cttacaacca gaggactttg ccacatacta ctgcg 45

<210> 112
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 112
ccaagatctt taattaacgg accgctactc acgtttgatt tccagttttg 50

<210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 113
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
1 5

<210> 114
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 114
ggcggcacaa aactggaaat c 21

<210> 115
<211> 59
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 115
gatgagttac ttcacaggca tatactttgt gcttttcata atcagctttt gacagtgtc 59

<210> 116
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 116
agtatatgcc tgtgaagtaa ctcatc 26

<210> 117
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 117
gccacgatgc gtccggc 17

<210> 118
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 118
gcacttgatg taattctcct tgg 23

<210> 119

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

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 119
gaagtagtcc ttgaccagg 19

<210> 120
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 120
gaagatgaag acagatggtg cag 23

<210> 121
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 121
cggtggaggg cagtgtagtc 20

<210> 122
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 122

gtgatgctat tgctttattt g 21

<210> 123
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 123
catacctacc agttctgcgc c 21

<210> 124
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 124
ccatcctgtt tgcttctttc c 21

<210> 125
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 125
gacagggctg ctgagtc 17

<210> 126
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mồi tổng hợp

<400> 126
gtgcagctcc aagagagtgg ac 22

<210> 127
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mồi tổng hợp

<400> 127
cagagtccat ccagcatgtc 20

<210> 128
<211> 363
<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 128
ttagtcaagc tgcaggagtc tggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgactatg cctggaactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagtt acagtgctaa cactaggtac 180
aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
cgcgggtttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca 360
ccc 363

<210> 129
<211> 116
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 129
Leu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

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

<210> 130
<211> 6
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 130
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 131
<211> 16
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 131
Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 132
Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 133
<211> 324

<212> ADN
<213> Chuột nhắt

<400> 133
gacattgtgc tgacccagtc tccatcctcc atgtctctat ctctgggaga cacagtcagt 60
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
gaagattttg tagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 134
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 134
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ile
20 25 30
Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr
35 40 45
His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu
65 70 75 80
Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 135
His Ser Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asn Ile Gly
1 5 10
<210> 136

<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 136
His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
1 5

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 137
Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 138
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 138
Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
1 5 10 15

<210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 139
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 140
<211> 7
<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<400> 140
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 141
His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
1 5

<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 142
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 143
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 144
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 145
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 145
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 146
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 146
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15
Ser

<210> 147
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 147
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 148
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 148

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

<210> 149
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 149
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 150
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 150
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
1 5 10 15
Ser

<210> 151
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp
<220>
<221> dấu hiệu MISC
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là gốc axit amin có nhóm R phân cực không tích điện

<400> 151
His Ser Ser Gln Asp Ile Xaa Ala Ala Ser Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp
<220>

<221> dấu hiệu MISC
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là axit amin có nhóm R phân cực tích điện

<400> 152
His Gly Thr Asn Leu Xaa Ala Ala Asp
1 5

<210> 153
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Gly, và gốc axit amin được thế bảo toàn đối với Ala hoặc Gly

<400> 153
Val Gln Tyr Xaa Ala Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 154
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm Phe, Tyr, và gốc axit amin được thế bảo toàn đối với Phe hoặc Tyr

<400> 154
Ser Asp Xaa Ala Ala Ala Trp Asn
1 5

<210> 155
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là nhóm axit amin có nhóm R phân cực không tích điện

<400> 155
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Xaa Ala Ala Pro Ser Leu
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 156
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> tổng hợp
<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (6)..(6)
<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm Gly, Ala, và gốc axit amin được thế bảo toàn đối với Gly hoặc Ala

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (6)..(6)
<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm Gly, Ala, và gốc axit amin được thế bảo toàn đối với Gly hoặc Ala

<400> 156
Tyr Ile Ser Tyr Ser Xaa Ala Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 157
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (15)..(15)
<223> Xaa là gốc axit amin bazơ

<400> 157
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Xaa Ala
1 5 10 15
Ala Ser

<210> 158
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<220>
<221> Dấu hiệu MISC

<222> (1)..(1)
<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm Val, Ala, và gốc axit amin được thế bảo toàn đối với Val hoặc Ala

<400> 158
Xaa Ala Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5 10
<210> 159
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là gốc axit amin có nhóm R phân cực không tích điện

<400> 159
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Xaa Ala Ala Pro Ser Leu
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 160
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vectơ tổng hợp

<400> 160
Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
20 25 30
Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe

```
    50                  55                  60
Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
65                  70                  75                  80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala
            100                 105                 110
Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125
```

<210> 161
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vectơ tổng hợp

<400> 161

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

<210> 162
<211> 11891
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> plasmit

<400> 162
ttcgaacggc ggtggtacct aacctggacc gcgtaagaga aagaccatcg tcggcggtgt 60
ccattccccg acggtttagg gtcactcctc cttccctagc ttccagtggt agcttcggtc 120
agtgggtcac ttcccccgaa ggtaggtgag gacacagaag agatgtccac aggtgtcggt 180
ccacgtcgag gttctctcac ctggacccga acagttcggc tcagtttgaa acagggattg 240
tacatgacac aggcctatga gatagagtag tctaaaacgc accttaacct attccgtcgg 300
tggtcccttt ccaaatctta cctacccgat gtatagtatg agacccttgt ggtctatagt 360
tggaagagac ttttcggcct agtgttagag ttccctgtgc agcttcttag tcaagaagga 420
ctttgacttg aggcaatgtc ggcgtctgtg tcgttgtata atgacgcatt ggcgaccgtc 480
tccgaagggg ataacccctg tcccgtggga tcactgtcac tcgtcgccat tctaccgtgt 540
ggcaccggcc ggagacgcgg acccgggtcg agacagggtg tggcgccagt gtaccgtgga 600
aaagagaagg tcggaggtgg ttcccggggt cgcacaaggg ggaccggggg tcgtcgttct 660
cgtggtcgcc gccgtgtcgg cgggacccga cggaccactt cctgatgaag gggctcgggc 720
actggcactc gaccttgtcg cctcgggact ggaggccgca cgtgtggaag gggcggcacg 780
acgtctcgtc gccggacatg tcggactcgt cgcaccactg gcacgggtcg tcgtcggacc 840
cgtgggtctg gatgtagacg ttgcacttgg tgttcgggtc gttgtggttc cacctgttct 900
tccacctcgg gttctcgacg ctgttctggg tgtggacggg ggggacgggt cggggtctcg 960
acgacccgcc tgggaggcac aaggacaagg gggggttcgg gttcctgtgg gactactagt 1020
cgtcctgggg gctccactgg acgcaccacc acctgcactc ggtgctcctg ggtctccact 1080
tcaagttaac catacacctg ccgcacctcc acgtgttgcg gttctggttc gggtctcttc 1140
tcgtcatgtt gtcgtggatg tcccaccaca ggcacgactg gcacgacgtg gtcctgaccg 1200
acttgccgtt ccttatgttt acgttccaga ggttgttccg ggacggtcgg gggtagcttt 1260
tctggtagtc gttccggttc ccggtcggtg ccctcggggt ccacatgtgg gacgggggga 1320
gggccctgct cacgtggttc ttggtccaca gggactggac agaccacttc ccgaagatgg 1380
ggtcgctgta gcggcacctc accctctcgt tgccggtcgg gctcttgttg atgttctggt 1440
gggggggtca cgacctgtcg ctgccgtcga agaaggacat gtcgttcgac tggcacctgt 1500
tctcgtccac cgtcgtcccg ttgcacaagt cgacgtcgca ctacgtgctc cgggacgtgt 1560
tggtgatgtg ggtcttctcg gactcggaca gggggccgtt cactactgct gcgccggcac 1620
gcctgctggc ttaagtaact agtattagtc ggtatggtgt aaacatctcc aaaatgaacg 1680
aaatttttg gagggtgtgg agggggactt ggactttgta ttttacttac gttaacaaca 1740
acaattgaac aaataacgtc gaatattacc aatgtttatt tcgttatcgt agtgtttaaa 1800
gtgtttattt cgtaaaaaaa gtgacgtaag atcaacacca aacaggtttg agtagttaca 1860
tagaatagta cagaccgccg gcggctataa acttttatac cgtataactt ttacagcggc 1920
tacactcaaa gacacattga ctatagcggt aaaaaggttt tcactaaaaa cccgtatgcg 1980
ctatagaccg ctatcgcgaa tatagcaaat gccccctacc gctatctgct gaaaccactg 2040
aacccgctaa gacacacagc gtttatagcg tcaaagctat atccactgtc tgctatactc 2100

cgatatagcg gctatctccg ctgtagttcg accgtgtacc ggttacgtat agctagatat 2160
gtaacttagt tataaccggt aatcggtata ataagtaacc aatatatcgt atttagttat 2220
aaccgataac cggtaacgta tgcaacatag gtatagtatt atacatgtaa atataaccga 2280
gtacaggttg taatggcggt acaactgtaa ctaataactg atcaataatt atcattagtt 2340
aatgccccag taatcaagta tcgggtatat acctcaaggc gcaatgtatt gaatgccatt 2400
taccgggcgg accgactggc gggttgctgg gggcgggtaa ctgcagttat tactgcatac 2460
aagggtatca ttgcggttat ccctgaaagg taactgcagt tacccacctc ataaatgcca 2520
tttgacgggt gaaccgtcat gtagttcaca tagtatacgg ttcatgcggg ggataactgc 2580
agttactgcc atttaccggg cggaccgtaa tacgggtcat gtactggaat accctgaaag 2640
gatgaaccgt catgtagatg cataatcagt agcgataatg gtaccactac gccaaaaccg 2700
tcatgtagtt acccgcacct atcgccaaac tgagtgcccc taaaggttca gaggtggggt 2760
aactgcagtt accctcaaac aaaaccgtgg ttttagttgc cctgaaaggt tttacagcat 2820
tgttgaggcg gggtaactgc gtttacccgc catccgcaca tgccaccctc cagatatatt 2880
cgtctcgagc aaatcacttg gcagtctagc ggacctctgc ggtaggtgcg acaaaactgg 2940
aggtatcttc tgtggccctg gctaggtcgg aggcgccggc ccttgccacg taaccttgcg 3000
cctaaggggc acggttctca ctgcattcat ggcggatatc tcagatatcc gggtggggga 3060
accgaagaat acgtacgata tgacaaaaac cgaaccccag atatgtgggg gcgaaggagt 3120
acaatatcca ctaccatatc gaatcggata tccacaccca ataactggta ataactggtg 3180
aggggataac cactgctatg aaaggtaatg attaggtatt gtaccgagaa acggtgttga 3240
gagaaataac cgatatacgg ttatgtgaca ggaagtctct gactgtgcct gagacataaa 3300
aatgtcctac cccagagtaa ataataaatg tttaagtgta tatgttgtgg tggcaggggt 3360
cacgggcgtc aaaaataatt tgtattgcac cctagaggtg cgcttagagc ccatgcacaa 3420
ggcctgtacc cgagaagagg ccatcgccgc ctcgaagatg taggctcggg acgagggtac 3480
ggaggtcgct gagtaccagc gagccgtcga ggaacgagga ttgtcacctc cggtctgaat 3540
ccgtgtcgtg ctacgggtgg tggtggtcac acggcgtgtt ccggcaccgc catcccatac 3600
acagactttt actcgagccc ctcgcccgaa cgtggcgact gcgtaaacct tctgaattcc 3660
gtcgccgtct tcttctacgt ccgtcgactc aacaacacaa gactattctc agtctccatt 3720
gagggcaacg ccacgacaat tgccacctcc cgtcacatca gactcgtcat gagcaacgac 3780
ggcgcgcgcg gtggtctgta ttatcgactg tctgattgtc tgacaaggaa aggtacccag 3840
aaaagacgtc agtggcagga actgtgcttc gaacggcggt ggtacctaac ctgaacctct 3900
tatgacaaag aacatcgtcg gcgttgtcca ttccccgacg gtttagggtc actcctcctt 3960
ccctagcttc cactggtagc ttcggtcagt tccccccgcct ggcgaaggta ggtgaggaca 4020
cagaagagat gtccacaagt gtcactataa gtctactgag tctcaggtag gtcgtacagt 4080
cagaggcacc ctctatccca ctgctattgg acagtaagtt cggttctgta gttgaggtta 4140
taacctaccg aggttgtctt cggaccattc aggaagtttc ctgattagat agtgccttgt 4200
ttgaacctgc tgccgcacgg tagctctaaa agtcccagac cgtcgccctg gctgatatgt 4260
gactggtaga gatcgaatgt tggtctcctg aaacggtgta tgatgacgca ggtcatgcga 4320
gtcaagggga cctgtaagcc gccgccgtgt tttgaccttt agtttgcact catcgccagg 4380
caattaattt ctaggaagat ttgagactcc cccagcctac tgcaccggta acaatgaatt 4440
tgtggtagga caaacgaaga aaggagtcct tggcagcgtc gagggaggca caagtagaag 4500
gggggtaggc tgctcgttga cttcagtccg tgtcggaggc accacacgga ggaattattg 4560

aaaatgggtt ctctccggtt tcaggtcacc tttcacctgt tgcgtgatgt ctcgcccttg 4620
agagtccttt cgcactgtct cgtcctgagt tttctaagtt gtatgtcgga tagaagatgg 4680
gactgtgaca gttttcgact aatacttttc gtgtttcata tacggacact tcattgagta 4740
gtccctgagt cgtcgggaca gtgattttca aaattatctc cgcttacgac tattcgccgg 4800
cacgcctgct ggcttaagta actagtatta gtcggtatgg tgtaaacatc tccaaaatga 4860
acgaaatttt ttggagggtg tggaggggga cttggacttt gtattttact tacgttaaca 4920
acaacaattg aacaaataac gtcgaatatt accaatgttt atttcgttat cgtagtgttt 4980
aaagtgttta tttcgtaaaa aaagtgacgt aagatcaaca ccaaacaggt ttgagtagtt 5040
acatagaata gtacagacct aggagatgcg gcctgcgtag caccggccgt agtggccgcg 5100
gtgtccacgc caacgaccgc ggatatagcg gctgtagtgg ctacccccttc tagcccgagc 5160
ggtgaagccc gagtactcgc gaacaaagcc gcacccatac caccgtccgg ggcaccggcc 5220
ccctgacaac ccgcggtaga ggaacgtacg tggtaaggaa cgccgccgcc acgagttgcc 5280
ggagttggat gatgacccga cgaaggatta cgtcctcagc gtattccctc tcgcagctgg 5340
agcccggcgc aacgaccgca aaaaggtatc cgaggcgggg ggactgctcg tagtgttttt 5400
agctgcgagt tcagtctcca ccgctttggg ctgtcctgat atttctatgg tccgcaaagg 5460
gggaccttcg agggagcacg cgagaggaca aggctgggac ggcgaatggc ctatggacag 5520
gcggaaagag ggaagccctt cgcaccgcga aagagtatcg agtgcgacat ccatagagtc 5580
aagccacatc cagcaagcga ggttcgaccc gacacacgtg cttgggggggc aagtcgggct 5640
ggcgacgcgg aataggccat tgatagcaga actcaggttg ggccattctg tgctgaatag 5700
cggtgaccgt cgtcggtgac cattgtccta atcgtctcgc tccatacatc cgccacgatg 5760
tctcaagaac ttcaccaccg gattgatgcc gatgtgatct tcttgtcata aaccatagac 5820
gcgagacgac ttcggtcaat ggaagccttt ttctcaacca tcgagaacta ggccgtttgt 5880
ttggtggcga ccatcgccac caaaaaaaca aacgttcgtc gtctaatgcg cgtctttttt 5940
tcctagagtt cttctaggaa actagaaaag atgccccaga ctgcgagtca ccttgctttt 6000
gagtgcaatt ccctaaaacc agtactctaa tagtttttcc tagaagtgga tctaggaaaa 6060
tttaattttt acttcaaaat ttagttagat ttcatatata ctcatttgaa ccagactgtc 6120
aatggttacg aattagtcac tccgtggata gagtcgctag acagataaag caagtaggta 6180
tcaacggact gaggggcagc acatctattg atgctatgcc ctcccgaatg gtagaccggg 6240
gtcacgacgt tactatggcg ctctgggtgc gagtggccga ggtctaaata gtcgttattt 6300
ggtcggtcgg ccttcccggc tcgcgtcttc accaggacgt tgaaataggc ggaggtaggt 6360
cagataatta acaacggccc ttcgatctca ttcatcaagc ggtcaattat caaacgcgtt 6420
gcaacaacgg taacgatgtc cgtagcacca cagtgcgagc agcaaaccat accgaagtaa 6480
gtcgaggcca agggttgcta gttccgctca atgtactagg gggtacaaca cgtttttcg 6540
ccaatcgagg aagccaggag gctagcaaca gtcttcattc aaccggcgtc acaatagtga 6600
gtaccaatac cgtcgtgacg tattaagaga atgacagtac ggtaggcatt ctacgaaaag 6660
acactgacca ctcatgagtt ggttcagtaa gactcttatc acatacgccg ctggctcaac 6720
gagaacgggc cgcagttatg ccctattatg gcgcggtgta tcgtcttgaa attttcacga 6780
gtagtaacct tttgcaagaa gccccgcttt tgagagttcc tagaatggcg acaactctag 6840
gtcaagctac attgggtgag cacgtgggtt gactagaagt cgtagaaaat gaaagtggtc 6900
gcaaagaccc actcgttttt gtccttccgt tttacggcgt tttttccctt attcccgctg 6960
tgcctttaca acttatgagt atgagaagga aaaagttata ataacttcgt aaatagtccc 7020

aataacagag tactcgccta tgtataaact tacataaatc tttttatttg tttatcccca 7080
aggcgcgtgt aaaggggctt ttcacggtgg actgcagatt ctttggtaat aatagtactg 7140
taattggata tttttatccg catagtgctc cgggactacc gagaaacgcc gtgggtagca 7200
agcattacaa ggcaccgtgg ctcctgttgg gagttctctt ttacattagt gtgaccgagt 7260
ggaagcccac ccggaaagac gcaaatattc ctctgtgaaa tacaaattct tccaaccatt 7320
taaggaacgc cgaaaccgtc ggttcgatct aggccgacac cttacacaca gtcaatccca 7380
caccttcag gggtccgagg ggtcgtccgt cttcatacgt ttcgtacgta gagttaatca 7440
gtcgttggtc cacacctttc aggggtccga ggggtcgtcc gtcttcatac gtttcgtacg 7500
tagagttaat cagtcgttgg tatcagggcg gggattgagg cgggtagggc ggggattgag 7560
gcgggtcaag gcgggtaaga ggcggggtac cgactgatta aaaaaaataa atacgtctcc 7620
ggctccggcg gagccggaga ctcgataagg tcttcatcac tcctccgaaa aaacctccgg 7680
atccgaaaac gtttttcgat cgaaccccgg tggcgagtct cgtggaaggt ggtaccggtg 7740
gagtcgttca agggtgaact tgtttttgta gttcgtttac atgaacacgg acggggtccc 7800
actctttcag gttcggtaca tatagaccca actaccatga cctcttcctg acgcgacgtt 7860
ttgggcgtgg gacctgacac tcgggttcac acatcttctc aatggactca ccttaaaact 7920
accgagatca tggaaagtca gactcccgag gttgtcactg tacatagagt cgggacaacg 7980
gtacaaagcc ctggggaagg cgtctctagg gttgttcgac cacaagacac ttcaaaagtt 8040
catgttggcc ttcggacgtc tctggttaaa ttccgtgagc acatttgcct attacctgta 8100
ccactcgttg gtcgtgggga ccaaacctta ccttgtcctc atatgagact acccttgtct 8160
acccgtggga aaaccaaccg gaaggttacc gaaaggaccc ggggttccag gcataatgac 8220
accacacccg cgtctgtttc ggataccgtc cctatagcac ctccgagtga tggcgcggac 8280
gaacatacga ccccagttct aatgtccttg tttacgactc cagtacggac gggtcaccct 8340
tgaggtttat cctgggacac ttccttaggc gtaccctcta gtagagaccc accgggcaaa 8400
gtagaacgta gctcatacac ttctgaaacc ccattatcgt tggaaactgg ggttcgggta 8460
aggacccttg accttaccac gtccgacggt atggttgaaa tcgtggttcc ggtacgccct 8520
cctcttacca gacttcgtgt agctcctccg gtagctcttt gattcgttcg ccgtggccat 8580
ggtgtaagct cggatgctag ggttcccccc ggacctgtta cgggcaccag actgacccaa 8640
ggtgctttgc aggttgtagt tgctgaaaag acgaccacag cggttagcgt cacggtcgta 8700
ggcgtaaggg gcctgacagc cggtcctctt ctttccaatg aaacttctgg cgccggggag 8760
acggttaaca ctggggaaac gtcactgtct tcggtagcag gcgtgtacgg aagagttact 8820
ctgaccgctg ctcgggaagg ttatgttttt gattaatctg aaactcacta gaactcggaa 8880
aggatcaagt agggtggggc ggggtctctc tagaaacact tccttggaat gaagacacca 8940
cactgtatta acctgtttga tggatgtctc taaatttcga gattccattt atattttaaa 9000
aattcacata ttacacaatt tgatgactaa gattaacaaa cacataaaat ctaaggttgg 9060
ataccttgac tacttaccct cgtcaccacc ttacggaaat tactcctttt ggacaaaacg 9120
agtcttcttt acggtagatc actactactc cgatgacgac tgagagttgt aagatgagga 9180
ggtttttttct tctctttcca tcttctgggg ttcctgaaag gaagtcttaa cgattcaaaa 9240
aactcagtac gacacaaatc attatcttga gaacgaacga aacgataaat gtggtgtttc 9300
ctttttcgac gtgacgatat gttcttttaa taccttttta taagacattg gaaatattca 9360
tccgtattgt caatattagt attgtatgac aaaaaagaat gaggtgtgtc cgtatctcac 9420
agacgataat tattgatacg agtttttaac acatggaaat cgaaaaatta aacatttccc 9480

caattattcc ttataaacta catatcacgg aactgatctc tagtattagt cggtatggtg 9540
taaacatctc caaaatgaac gaaatttttt ggagggtgtg gaggggact tggactttgt 9600
attttactta cgttaacaac aacaattgaa caaataacgt cgaatattac caatgtttat 9660
ttcgttatcg tagtgtttaa agtgtttatt tcgtaaaaaa agtgacgtaa gatcaacacc 9720
aaacaggttt gagtagttac atagaatagt acagacctag atcgaagcac agttcctgcc 9780
actgacgtca cttattattt tacacacaaa caggctttat gcgcaaaact ctaaagacag 9840
cggctgattt aagtacagcg cgctatcacc acaaatagcg gctatctcta ccgctataac 9900
ctttttagct ataaactttt ataccgtata acttttacag cggctacact caaagacaca 9960
ttgactatag cggtaaaaag gttttcacta aaaacccgta tgcgctatag accgctatcg 10020
cgaatatagc aaatgccccc taccgctatc tgctgaaacc actgaacccg ctaagacaca 10080
cagcgtttat agcgtcaaag ctatatccac tgtctgctat actccgatat agcggctatc 10140
tccgctgtag ttcgaccgtg taccggttac gtatagctag atatgtaact tagttataac 10200
cggtaatcgg tataataagt aaccaatata tcgtatttag ttataaccga taaccggtaa 10260
cgtatgcaac ataggtatag tattatacat gtaaatataa ccgagtacag gttgtaatgg 10320
cggtacaact gtaactaata actgatcaat aattatcatt agttaatgcc ccagtaatca 10380
agtatcgggt atatacctca aggcgcaatg tattgaatgc catttaccgg gcggaccgac 10440
tggcgggttg ctgggggcgg gtaactgcag ttattactgc atacaagggt atcattgcgg 10500
ttatccctga aaggtaactg cagttaccca cctcataaat gccatttgac gggtgaaccg 10560
tcatgtagtt cacatagtat acggttcatg cgggggataa ctgcagttac tgccatttac 10620
cgggcggacc gtaatacggg tcatgtactg gaataccctg aaaggatgaa ccgtcatgta 10680
gatgcataat cagtagcgat aatggtacca ctacgccaaa accgtcatgt agttacccgc 10740
acctatcgcc aaactgagtg cccctaaagg ttcagaggtg gggtaactgc agttaccctc 10800
aaacaaaacc gtggttttag ttgccctgaa aggttttaca gcattgttga ggcggggtaa 10860
ctgcgtttac ccgccatccg cacatgccac cctccagata tattcgtctc gagcaaatca 10920
cttggcagtc tagcggacct ctgcggtagg tgcgacaaaa ctggaggtat cttctgtggc 10980
cctggctagg tcggaggcgc cggcccttgc cacgtaacct tgcgcctaag gggcacggtt 11040
ctcactgcat tcatggcgga tatctcagat atccgggtgg gggaaccgaa gaatacgtac 11100
gatatgacaa aaaccgaacc ccagatatgt gggggcgaag gagtacaata tccactacca 11160
tatcgaatcg gatatccaca cccaataact ggtaataact ggtgagggga taaccactgc 11220
tatgaaaggt aatgattagg tattgtaccg agaaacggtg ttgagagaaa taaccgatat 11280
acggttatgt gacaggaagt ctctgactgt gcctgagaca taaaaatgtc ctaccccaga 11340
gtaaataata aatgtttaag tgtatatgtt gtggtggcag gggtcacggg cgtcaaaaat 11400
aatttgtatt gcaccctaga ggtgcgctta gagcccatgc acaaggcctg tacccgagaa 11460
gaggccatcg ccgcctcgaa gatgtaggct cgggacgagg gtacggaggt cgctgagtac 11520
cagcgagccg tcgaggaacg aggattgtca cctccggtct gaatccgtgt cgtgctacgg 11580
gtggtggtgg tcacacggcg tgttccggca ccgccatccc atacacagac ttttactcga 11640
gcccctcgcc cgaacgtggc gactgcgtaa accttctgaa ttccgtcgcc gtcttcttct 11700
acgtccgtcg actcaacaac acaagactat tctcagtctc cattgagggc aacgccacga 11760
caattgccac ctcccgtcac atcagactcg tcatgagcaa cgacggcgcg cgcggtggtc 11820
tgtattatcg actgtctgat tgtctgacaa ggaaaggtac ccagaaaaga cgtcagtggc 11880
aggaactgtg c 11891

<210> 163
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 163
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser

<210> 164
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 164
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
20 25 30
Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 165

<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 165
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser

<210> 166
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 166
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45
Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 167
<211> 116
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 167

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

<210> 168
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 168

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 169
<211> 80

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 169
acctaacctg gaccgcgtaa gagaaagacc atcgtcggcg gtgtccattc cccgacggtt 60
tagggtcact cctccttccc 80

<210> 170
<211> 81
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 170
atcccagtga ggaggaaggg atcgaaggtc accatcgaag ccagtcaagg gggcttccat 60
ccactcctgt gtcttctcta c 81

<210> 171
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 171
ggtgaggaca cagaagagat gtccacaggt gtcggtccac gtcgaggttc tctcacctgg 60
acccgaacag ttcggctcag 80

<210> 172
<211> 85
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 172
tgggcttgtc aagccgagtc aaactttgtc cctaacatgt actgtgtccg gatactctat 60
ctcatcagat tttgcgtgga attgg 85

<210> 173
<211> 82
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 173
gagtagtcta aaacgcacct taacctattc cgtcggtggt ccctttccaa atcttaccta 60
cccgatgtat agtatgagac cc 82

<210> 174
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 174
gggctacata tcatactctg ggaacaccag atatcaaccc tctctgaaaa gccggatcac 60
aatcactagg gacacgtcga 80

<210> 175
<211> 83
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 175
gttagtgatc cctgtgcagc ttctcggtca agaaggacgt cgacttgagg caatgtcggg 60
gtctgtgtcg ttgtataatg acg 83

<210> 176
<211> 82
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 176
ccagacacag caacatatta ctgcgtaacc gctggcagag gcttccccta ttggggacag 60
ggcaccctag tgacagtgag ca 82

<210> 177
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 177
gtgggatcac tgtcactcgt cgccattcta cctaggcac 39

<210> 178
<211> 1128
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 178
ttctaccgtg tggcaccggc cggagacgcg gacccgggtc gagacagggt gtggcgccag 60
tgtaccgtgg aaaagagaag gtcggaggtg gttcccgggg tcgcacaagg gggaccgggg 120

gtcgtcgttc tcgtggtcgc cgccgtgtcg gcgggacccg acggaccact tcctgatgaa 180
ggggctcggg cactggcact cgaccttgtc gcctcgggac tggaggccgc acgtgtggaa 240
ggggcggcac gacgtctcgt cgccggacat gtcggactcg tcgcaccact ggcacgggtc 300
gtcgtcggac ccgtgggtct ggatgtagac gttgcacttg gtgttcgggt cgttgtggtt 360
ccacctgttc ttccacctcg ggttctcgac gctgttctgg gtgtggacgg gggggacggg 420
tcggggtctc gacgacccgc ctgggaggca caaggacaag gggggggttcg ggttcctgtg 480
ggactactag tcgtcctggg ggctccactg gacgcaccac cacctgcact cggtgctcct 540
gggtctccac ttcaagttaa ccatacacct gccgcacctc cacgtgttgc ggttctggtt 600
cgggtctctt ctcgtcatgt tgtcgtggat gtcccaccac aggcacgact ggcacgacgt 660
ggtcctgacc gacttgccgt tccttatgtt tacgttccag aggttgttcc gggacggtcg 720
ggggtagctt ttctggtagt cgttccggtt cccggtcggt gccctcgggg tccacatgtg 780
ggacgggggg agggccctgc tcacgtggtt cttggtccac agggactgga cagaccactt 840
cccgaagatg gggtcgctgt agcggcacct caccctctcg ttgccggtcg ggctcttgtt 900
gatgttctgg tgggggggtc acgacctgtc gctgccgtcg aagaaggaca tgtcgttcga 960
ctggcacctg ttctcgtcca ccgtcgtccc gttgcacaag tcgacgtcgc actacgtgct 1020
ccgggacgtg ttggtgatgt gggtcttctc ggactcggac aggggccgt tcactactgc 1080
tgcgccggca cgcctgctgg cttaagtaac tagtattagt cggtatgg 1128

<210> 179
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 179
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45
Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 180
<211> 107

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 180

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

<210> 181
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 181
gaacggcggt ggtacctaac ctgaacctct tatgacaaag aacatcgtcg gcgttgtcca 60
ttccccgacg gtttagggtc 80

<210> 182
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 182
aaggggctgc caaatcccag tgaggaggaa gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca 60
agggggcttc catccactcc 80

<210> 183
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 183
tcccccgaag gtaggtgagg acacagaaga gatgtccaca agtgtcacta taagtctact 60
gagtctcagg taggtcgtac 80

<210> 184
<211> 82
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 184
gttcggttct gtagttgagg ttataaccta ccgaggttgt cttcggacca ttcaggaagt 60
ttcctgatta gatagtgcct tg 82

<210> 185
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 185
gaccgtcgcc ctggctgata tgtgactggt agagatcgaa tctcggtctt ctgaaacggt 60
gtatgatgac gcaggtcgtg 80

<210> 186
<211> 80
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 186
catactactg cgtccagcac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc acaaaactgg 60
aaatcaaacg tgagtaggga 80

<210> 187
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 187
cctttagttt gcactcatcc ctaggctc 28

<210> 188
<211> 233
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 188
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
35 40 45
Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
50 55 60
Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln
100 105 110
Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Val Tyr Pro
145 150 155 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gly
195 200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln His Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 189
<211> 704
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 189
atggtgtcca cagctcagtt ccttgcattc ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt 60
gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 180
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300
gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttg 704

<210> 190
<211> 702
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 190
atggattgga cttggagaat actgtttctt gtagcagccg caacaggtgt tcacagtgat 60
attcagatga ctcagagtcc atccagcatg tcagtctccg tgggagatag ggtgacgata 120
acctgtcatt caagccaaga catcaactcc aatattggat ggctccaaca gaagcctggt 180
aagtccttca aaggactaat ctatcacgga acaaacttgg acgacggcgt gccatcgaga 240
ttttcagggt ctggcagcgg gaccgactat acactgacca tctctagctt acaaccagag 300
gactttgcca catactactg cgtccagtac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc 360
acaaaactgg aaatcaaacg aaccgtcgca gctccctccg tgttcatctt cccccccatcc 420
gacgagcaac tgaagtcagg cacagcctcc gtggtgtgcc tccttaataa cttttaccca 480
agagaggcca aagtccagtg gaaagtggac aacgcactac agagcgggaa ctctcaggaa 540
agcgtgacag agcaggactc aaaagattca acatacagcc tatcttctac cctgacactg 600
tcaaaagctg attatgaaaa gcacaaagta tatgcctgtg aagtaactca tcagggactc 660
agcagccctg tcactaaaag ttttaataga ggcgaatgct ga 702

<210> 191
<211> 408
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 191
gccaccatga gagtgctgat tcttttgtgg ctgttcacag cctttcctgg tgtcctgtct 60
gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagac tctgtccctc 120
acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgattttg cctggaactg gatccggcag 180
tttccaggaa acaagctgga gtggatgggc tacataagtt atagtggtaa cactaggtac 240
aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 300
ctgcagttga attctgtgac tattgaggac acagccacat attactgtgt aacggcggga 360
cgcgggtttc cttattgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 408

<210> 192
<211> 405
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 192
atggattgga cctggcgcat tctctttctg gtagcagccg ccacaggtgt ccacagccag 60
gtgcagctcc aagagagtgg acctgggctt gtcaagccga gtcaaacttt gtccctaaca 120
tgtactgtgt ccggatactc tatctcatca gattttgcgt ggaattggat aaggcagcca 180
ccagggaaag gtttagaatg gatgggctac atatcatact ctgggaacac cagatatcaa 240
ccttctctga aaagccggat cacaatctca agggacacgt cgaagaatca gttcttcctg 300
aaactgaact ccgttacagc cgcagacaca gcaacatatt actgcgtaac cgctggcaga 360
ggcttcccct attggggaca gggcacccta gtgacagtga gcagc 405

<210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 193
Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 194
Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
1 5

<210> 195
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt

<400> 195

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

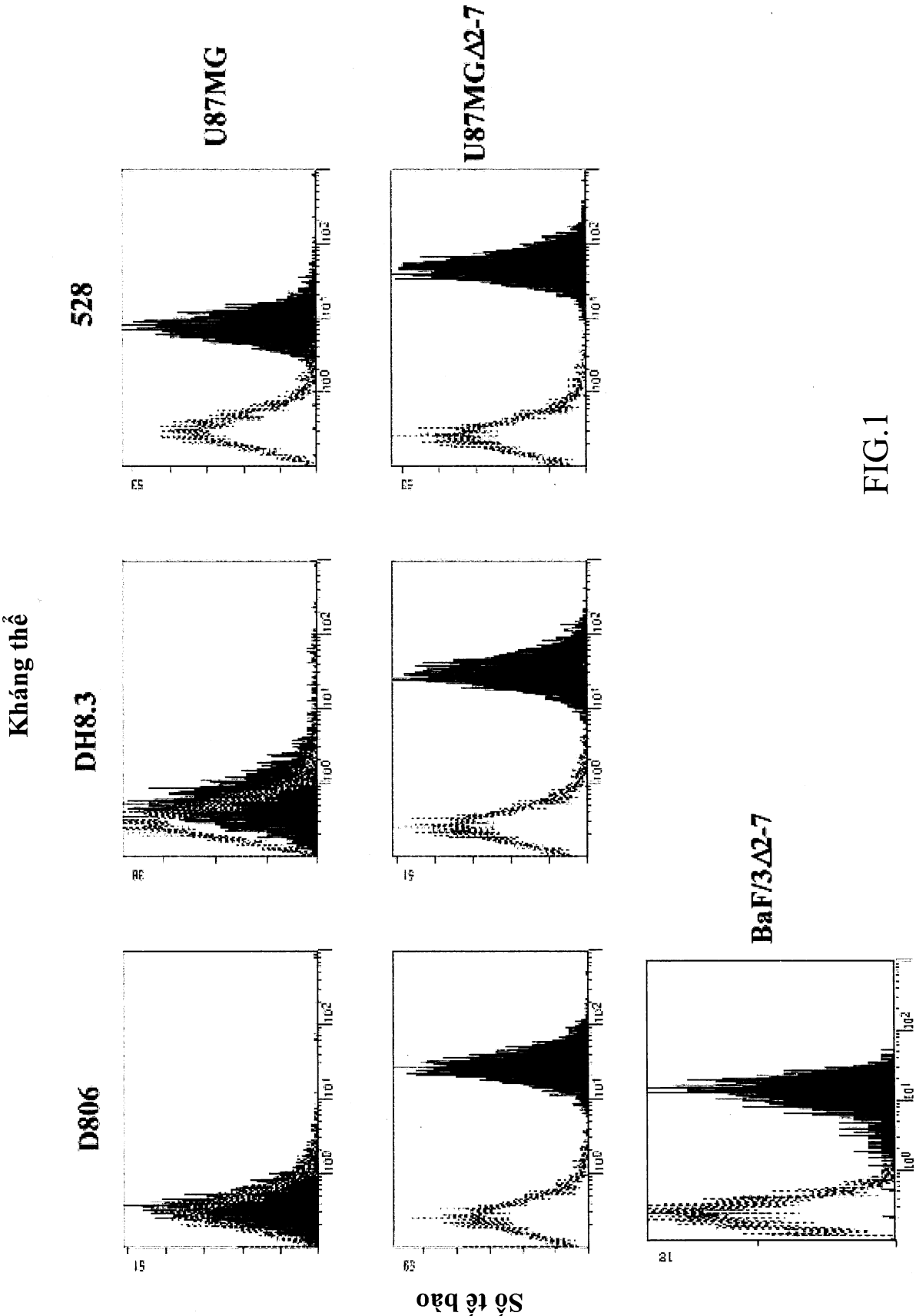

Kháng thể
D806
DH8.3
528
U87MG
U87MGΔ2-7
BaF/3Δ2-7
Số tế bào
Cường độ ánh sáng huỳnh quang

FIG.1

FIG.2B

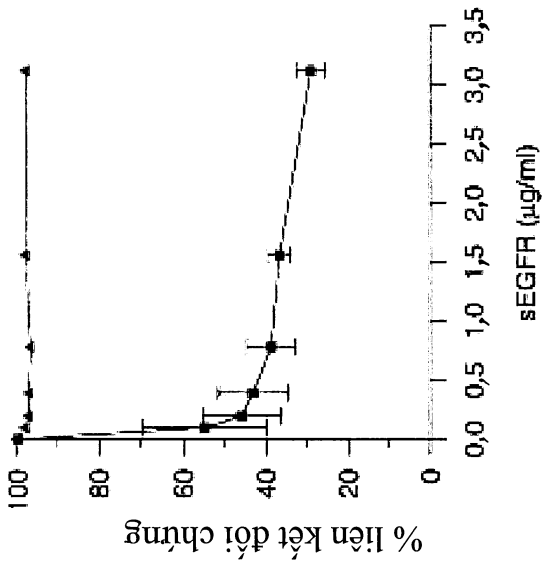
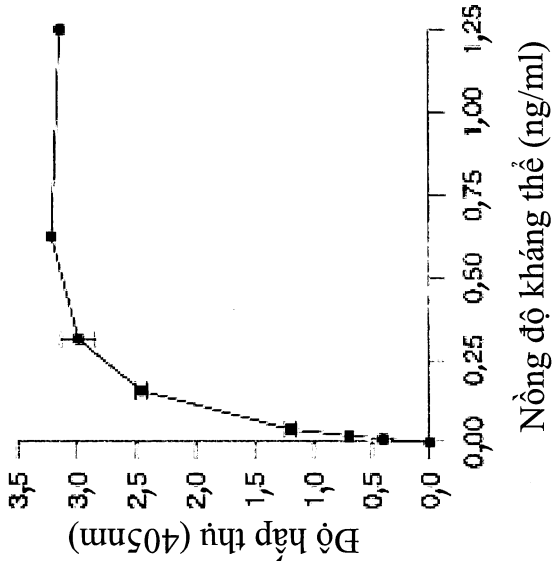


FIG.2D



FIG

FIG.2A

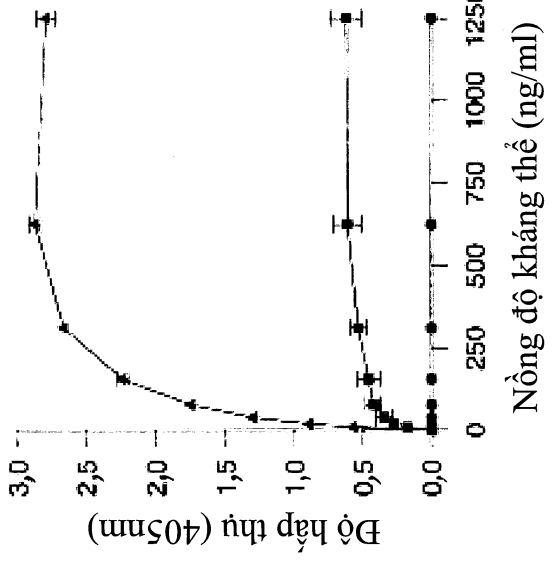
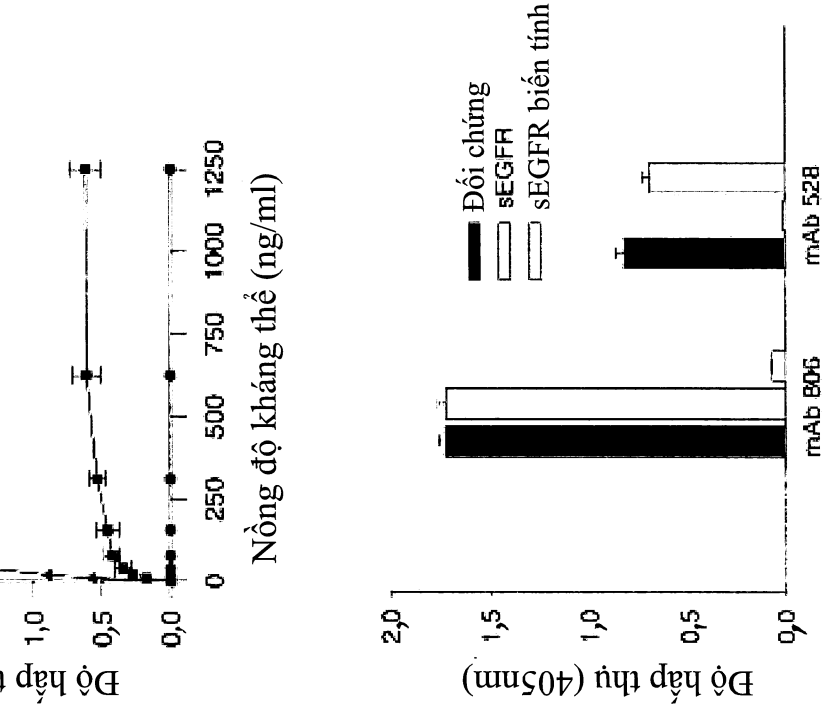


FIG.2C



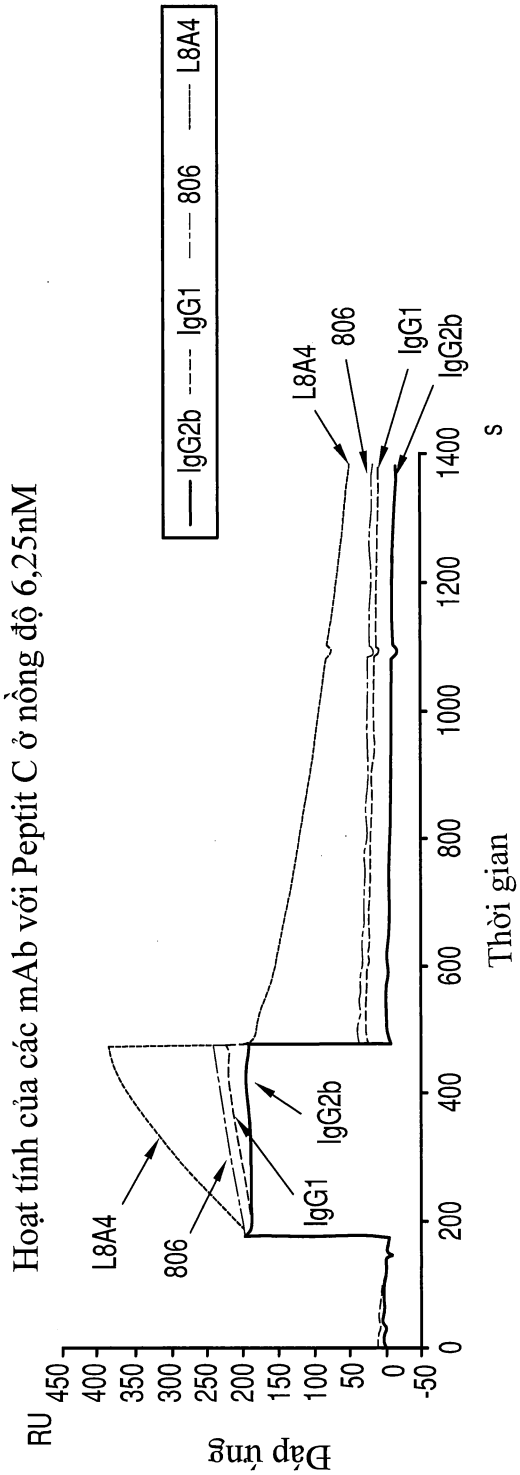

Hoạt tính của các mAb với Peptit C ở nồng độ 6,25nM
IgG2b
IgG1
806
L8A4
RU
Đáp ứng
Thời gian
s
L8A4
806
IgG1
IgG2b

FIG. 2E

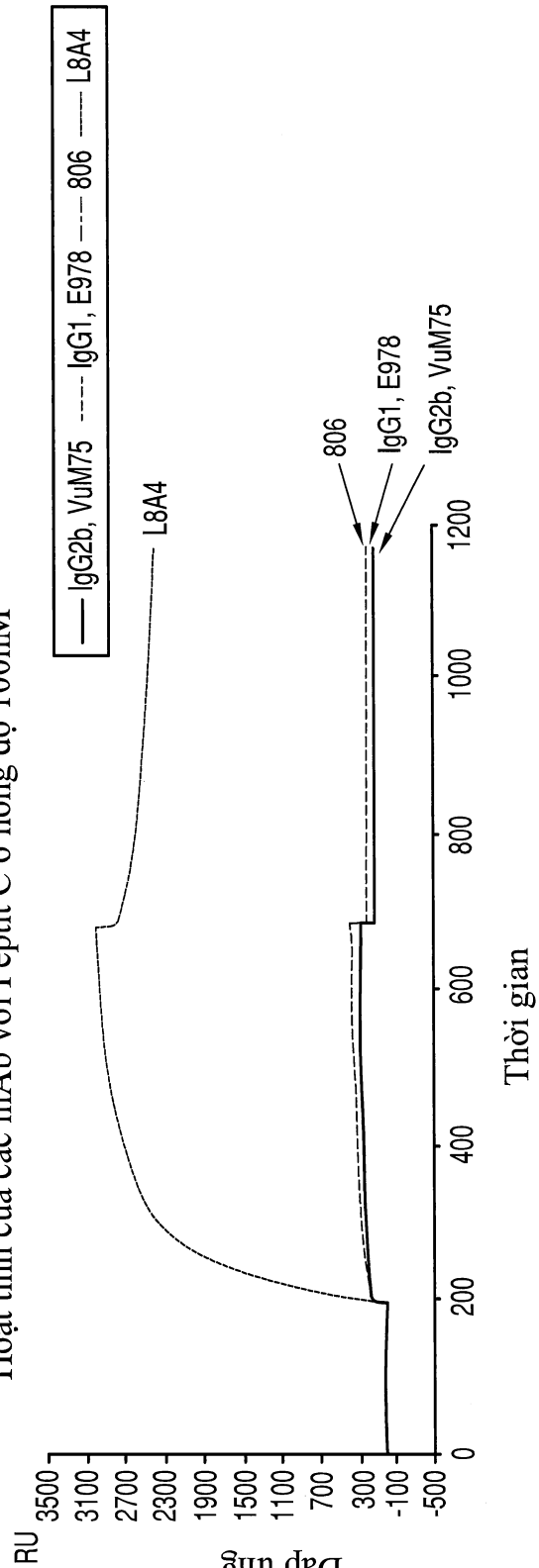

Hoạt tính của các mAb với Peptit C ở nồng độ 100nM
IgG2b, VuM75
IgG1, E978
806
L8A4
RU
Đáp ứng
Thời gian
L8A4
806
IgG1, E978
IgG2b, VuM75

FIG. 2F

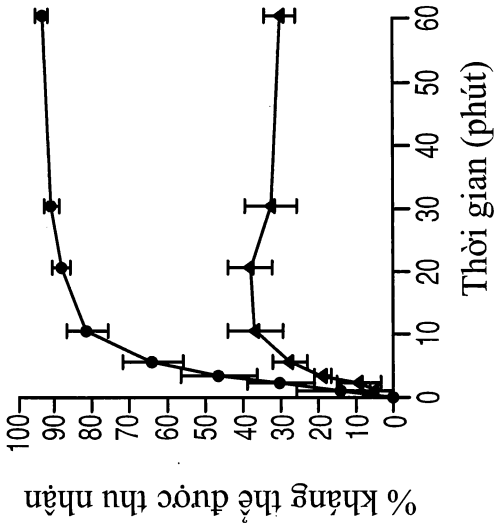

% kháng thể được thu nhận
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
Thời gian (phút)

FIG. 3

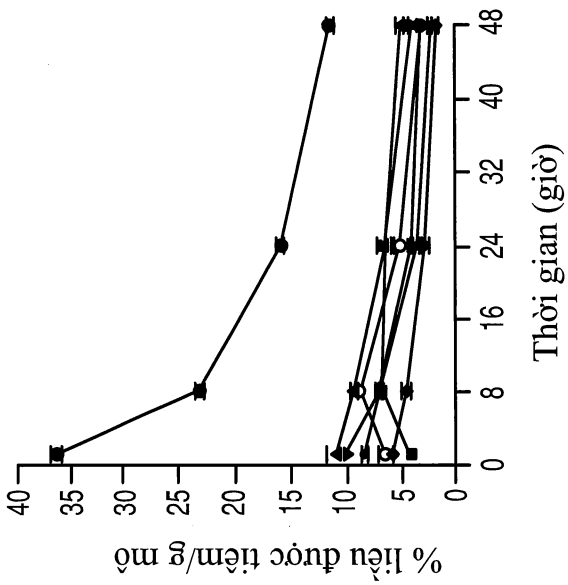

% liều được tiêm/g mô
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Thời gian (giờ)
0
8
16
24
32
40
48

FIG. 4B

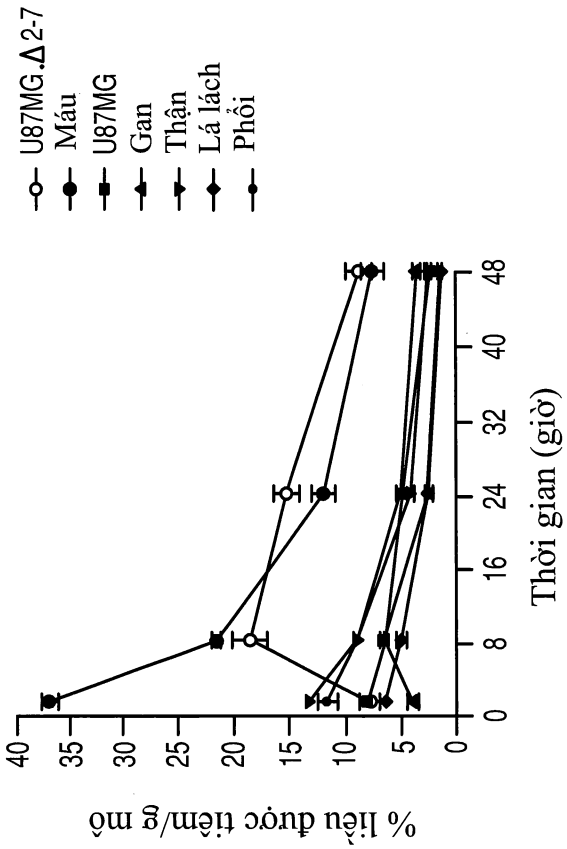

U87MG.Δ2-7
Máu
U87MG
Gan
Thận
Lá lách
Phổi
% liều được tiêm/g mô
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Thời gian (giờ)
0
8
16
24
32
40
48

FIG. 4A

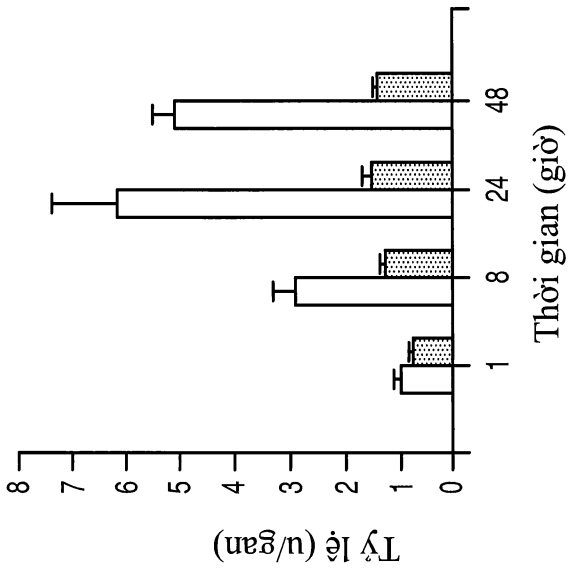

Tỷ lệ (u/gan)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
1
8
24
48
Thời gian (giờ)

FIG. 5B

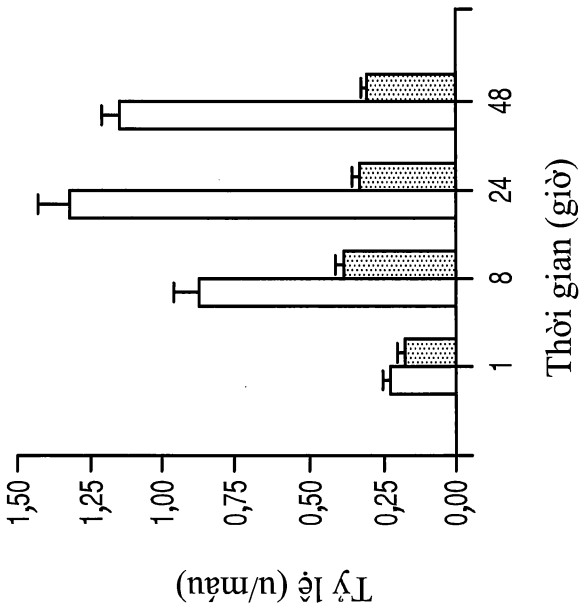

Tỷ lệ (u/mẫu)
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
1,25
1,50
1
8
24
48
Thời gian (giờ)

FIG. 5A

FIG. 6A

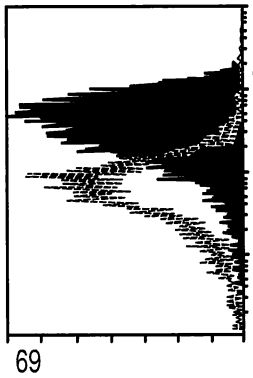


FIG. 6B

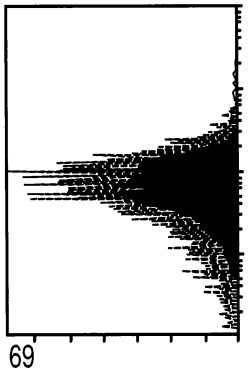
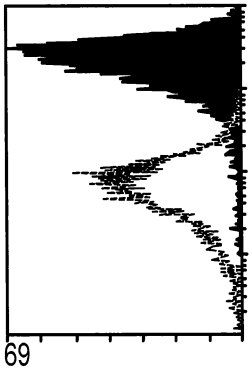


FIG. 6C



Số tế bào

Cường độ ánh sáng huỳnh quang

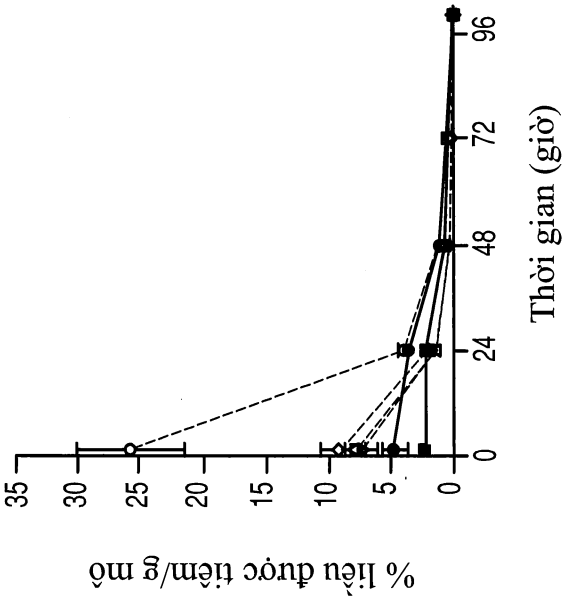

% liều được tiêm/g mô
0
5
10
15
20
25
30
35
0
24
48
72
96
Thời gian (giờ)

FIG. 7B

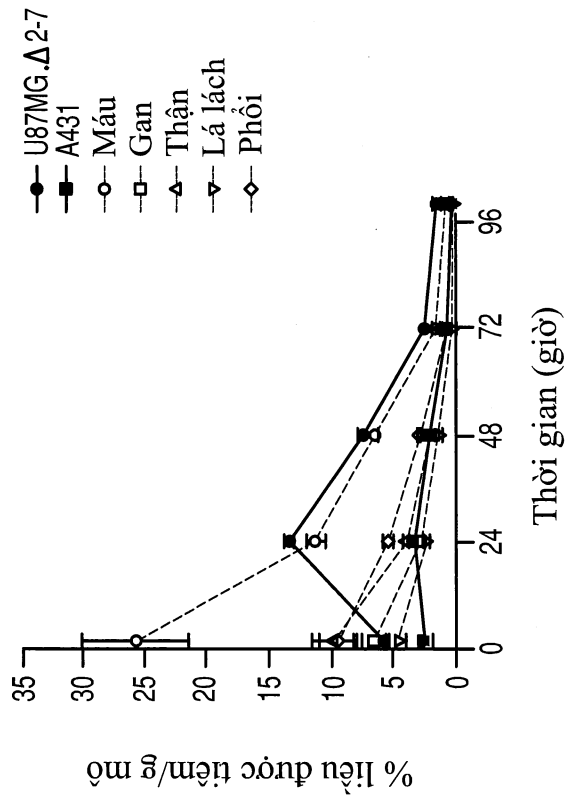

U87MG.Δ2-7
A431
Máu
Gan
Thận
Lá lách
Phổi
% liều được tiêm/g mô
0
5
10
15
20
25
30
35
0
24
48
72
96
Thời gian (giờ)

FIG. 7A

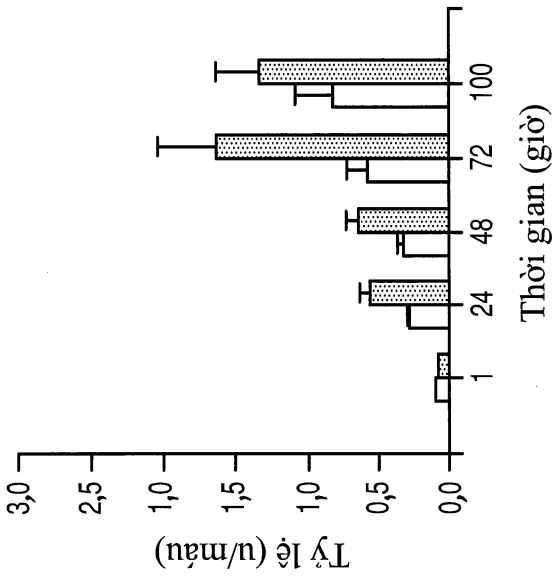


FIG. 8B

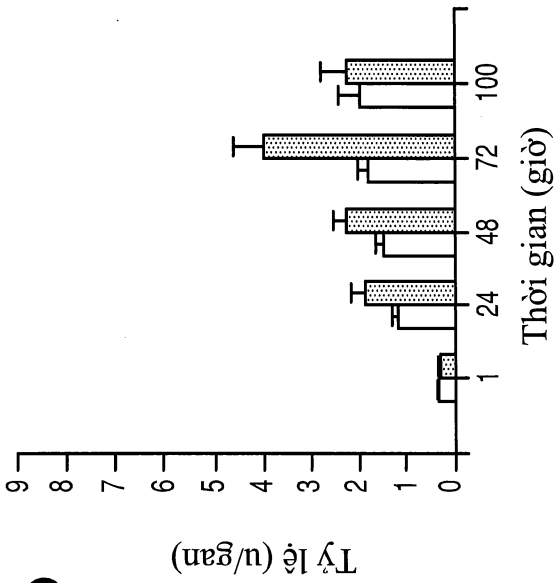


FIG. 8D

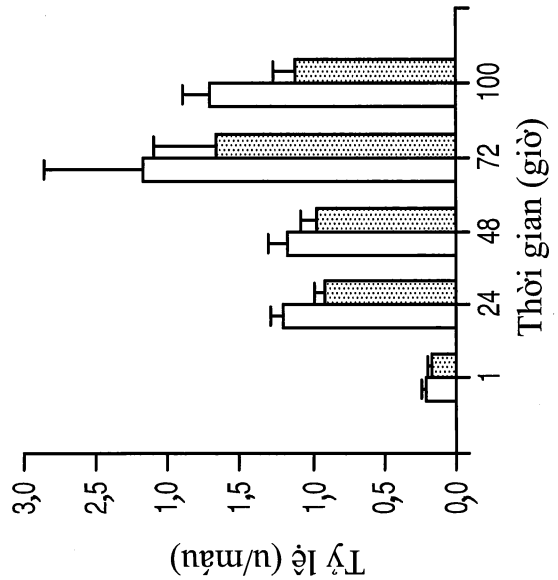


FIG. 8A

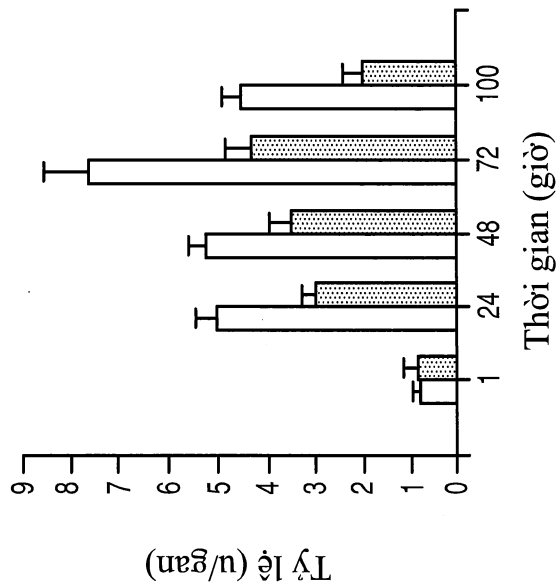


FIG. 8C

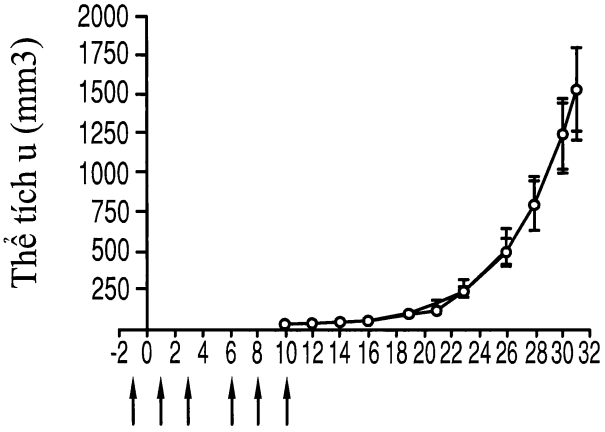

Thể tích u (mm3)
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
-2 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32

FIG. 9A

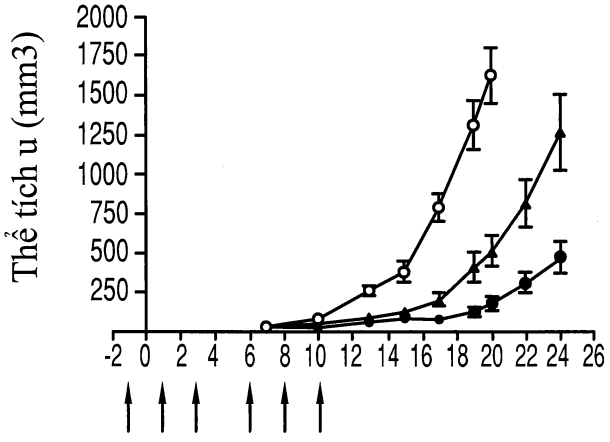

Thể tích u (mm3)
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
-2 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
Ngày sau khi chủng

FIG. 9B

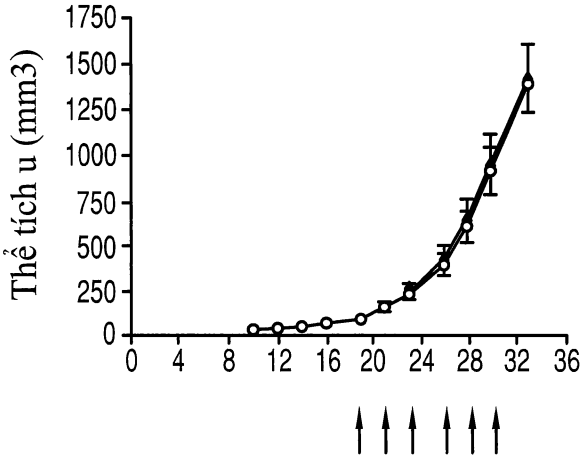


FIG. 10A

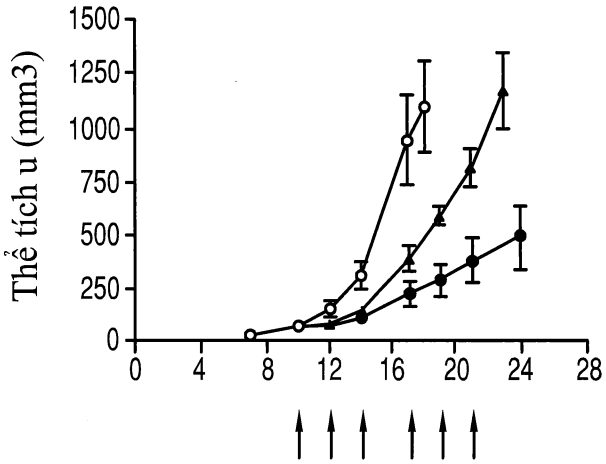


FIG. 10B

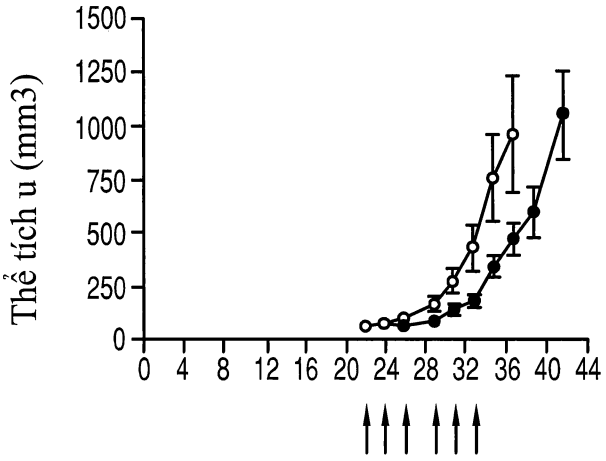


FIG. 10C

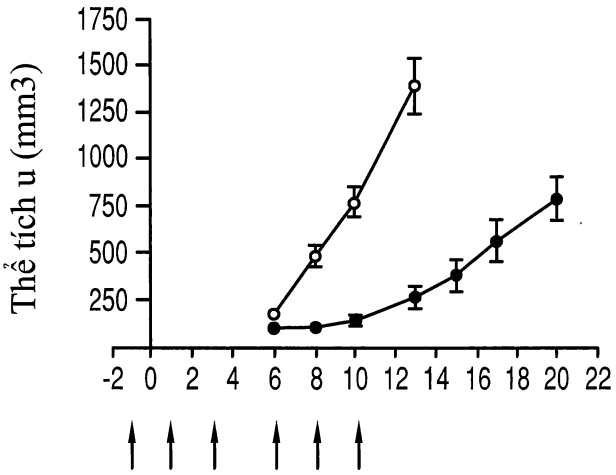


FIG. 11A

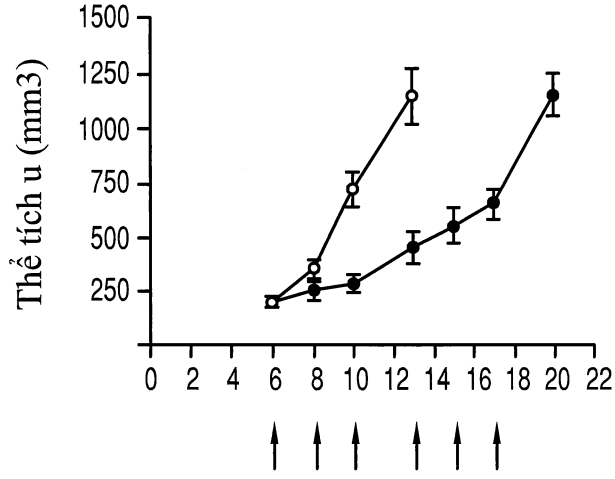


FIG. 11B

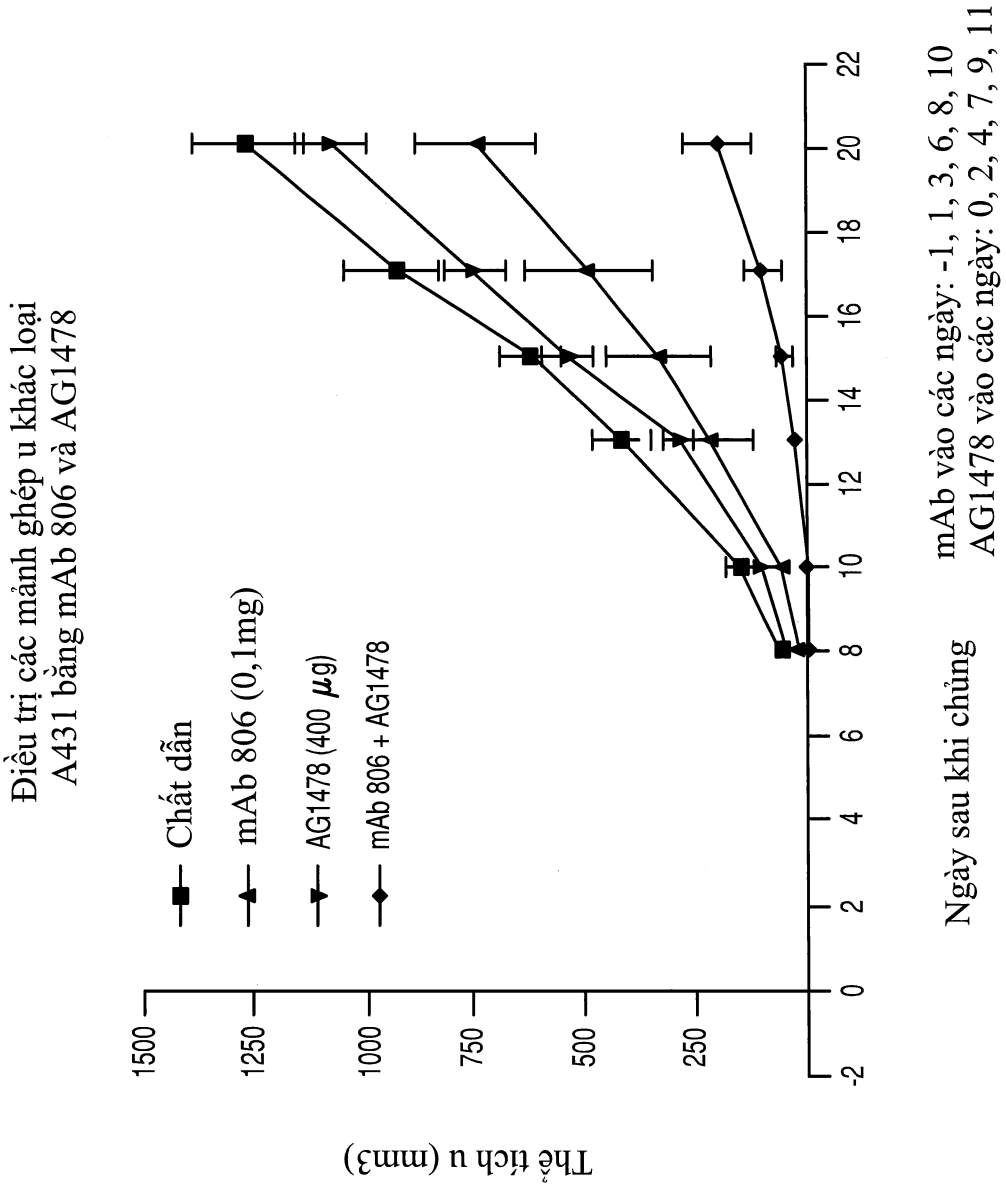

Điều trị các mảnh ghép u khác loại
A431 bằng mAb 806 và AG1478
Chất dẫn
mAb 806 (0,1mg)
AG1478 (400 µg)
mAb 806 + AG1478
Thể tích u (mm3)
1500
1250
1000
750
500
250
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Ngày sau khi chủng
mAb vào các ngày: -1, 1, 3, 6, 8, 10
AG1478 vào các ngày: 0, 2, 4, 7, 9, 11

FIG. 12

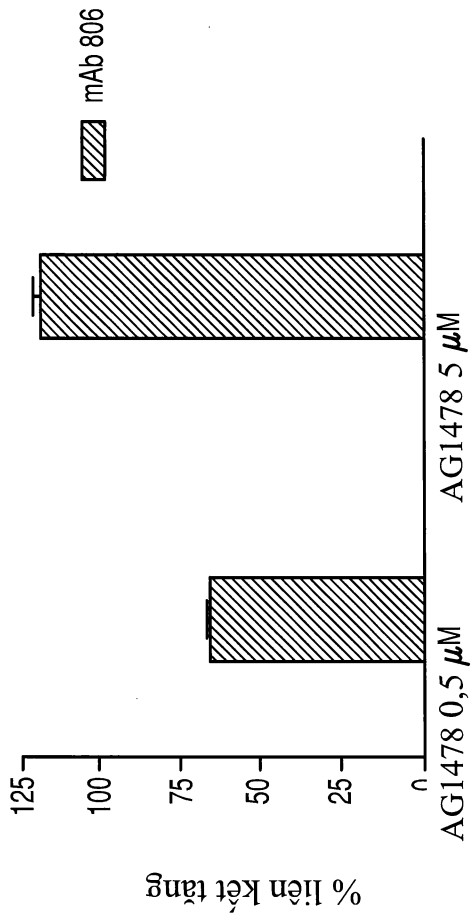


FIG. 13

Chuỗi VH của mAb806 (bao gồm cả peptit tín hiệu): Trình tự axit nucleic và axit amin

Trình tự axit nucleic

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTCACAGCCTTTCCTGGTGTCCTGTCTGATG
TGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCA
CCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGAACTGGATCCGGC
AGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACT
AGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAAC
CAATTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGT
GTAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
GCA (SEQ ID NO:1)

FIG.14A

Trình tự axit amin

MRVLILLWLFTAFPGVLSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFP

peptit tín hiệu

GNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG

FPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:2)

FIG.14B

Chuỗi VL của mAb806 (bao gồm cả peptit tín hiệu): Trình tự axit nucleic và axit amin

-- Trình tự axit nucleic

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCATTCTTGTTGCTTTGGTTTCCAGGTGCAAGAT
GTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAG
TCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGC
AGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGGACGAT
GAAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATC
AGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTT
CCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT (SEQ ID NO:3)

FIG.15A

Trình tự axit amin

MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRP
peptit tín hiệu
GKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGG

GTKLEIKR (SEQ ID NO:4)

FIG.15B

Chuỗi HL của mAb806 (không bao gồm peptit tín hiệu): Trình tự axit amin

DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLN
CDR1 *CDR2*
SVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:11)
CDR3

FIG.16

Chuỗi VL của mAb806 (không bao gồm peptit tín hiêu): Trình tự axit amin

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFAD
CDR1 *CDR2*
YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:12)
CDR3

FIG.17

FIG.18A

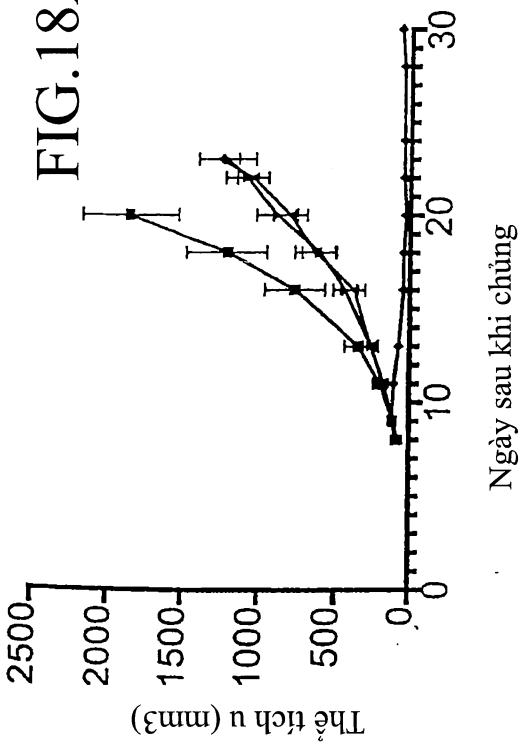


FIG.18B

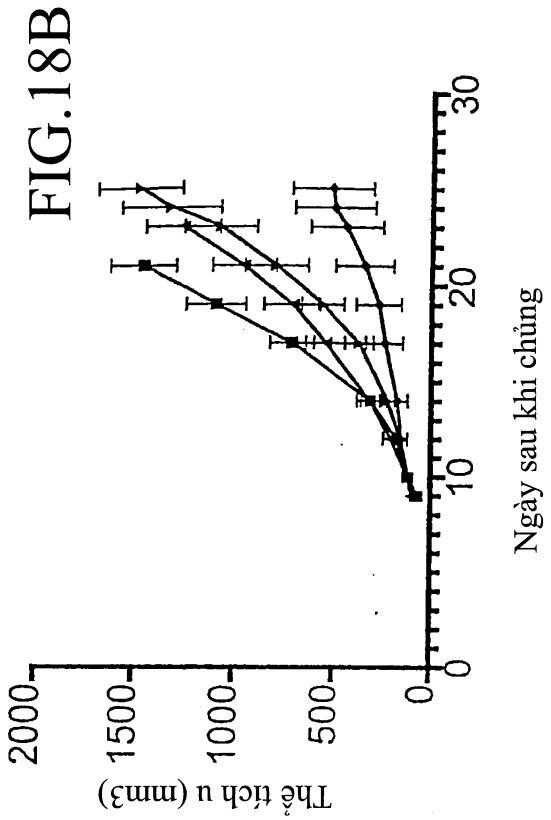


FIG.18C

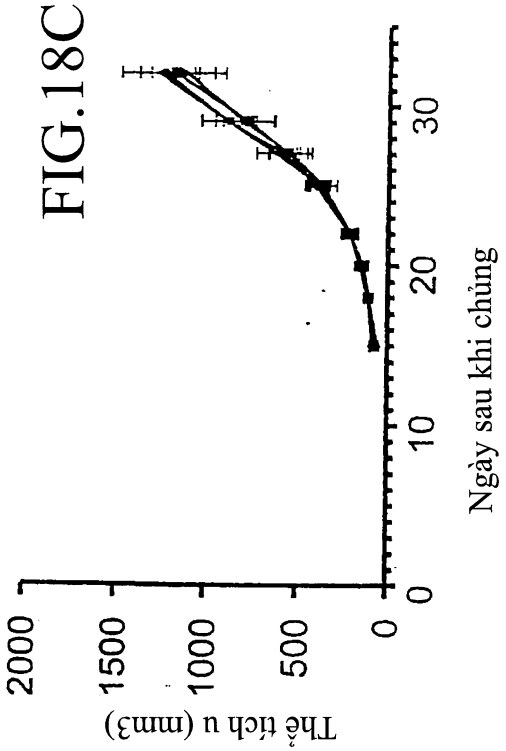
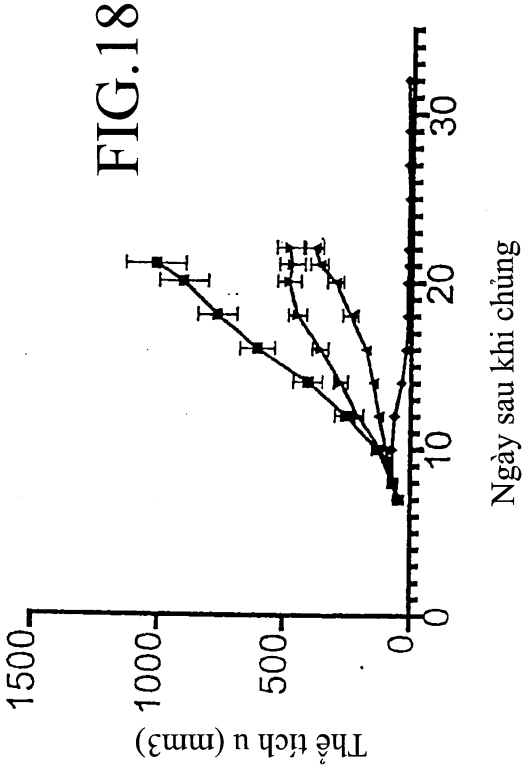


FIG.18D



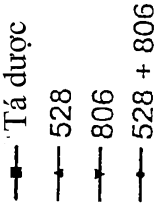


FIG. 19A

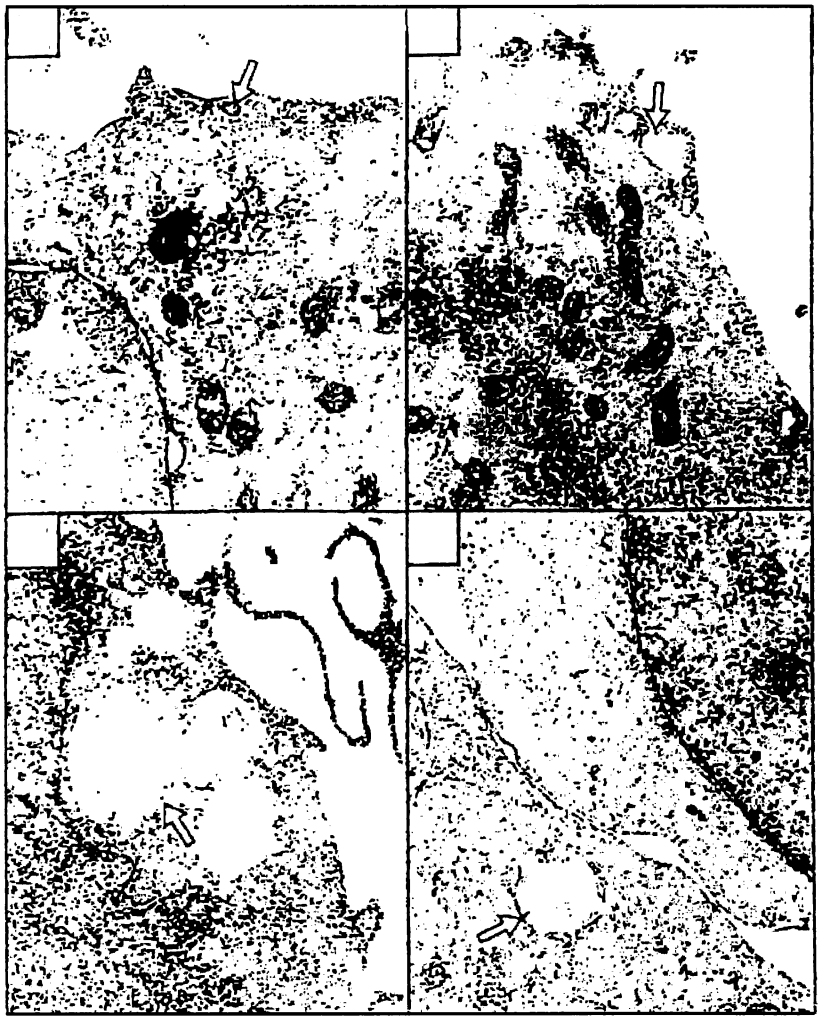


FIG. 19B

FIG. 19C

FIG. 19D

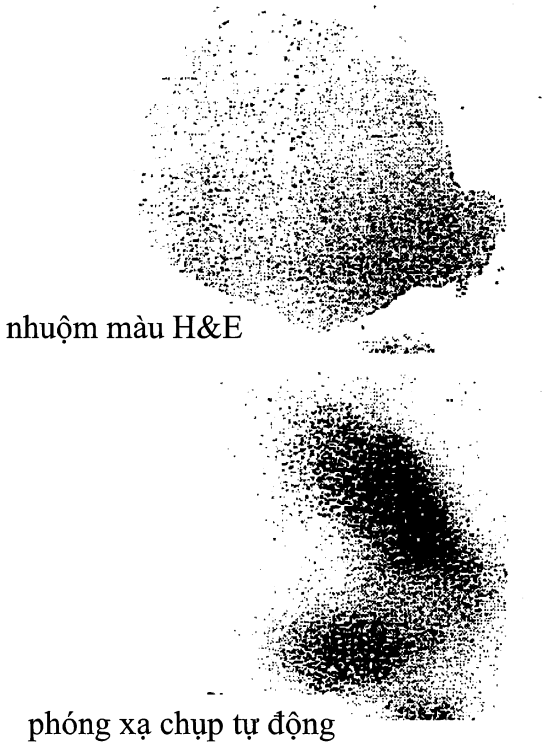


FIG. 20

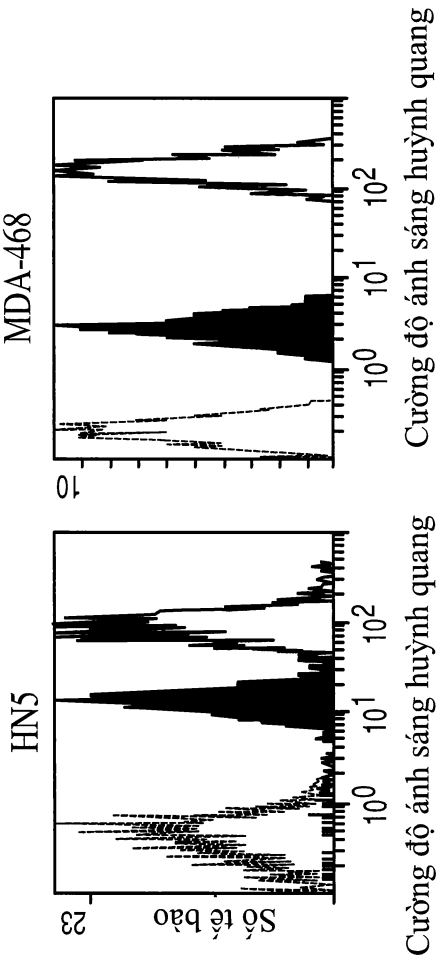

HN5
MDA-468
Số tế bào
23
10
10^0
10^1
10^2
Cường độ ánh sáng huỳnh quang
Cường độ ánh sáng huỳnh quang

FIG. 21

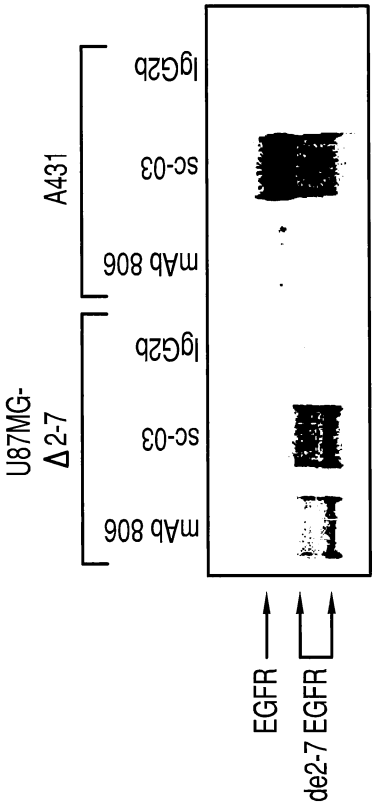
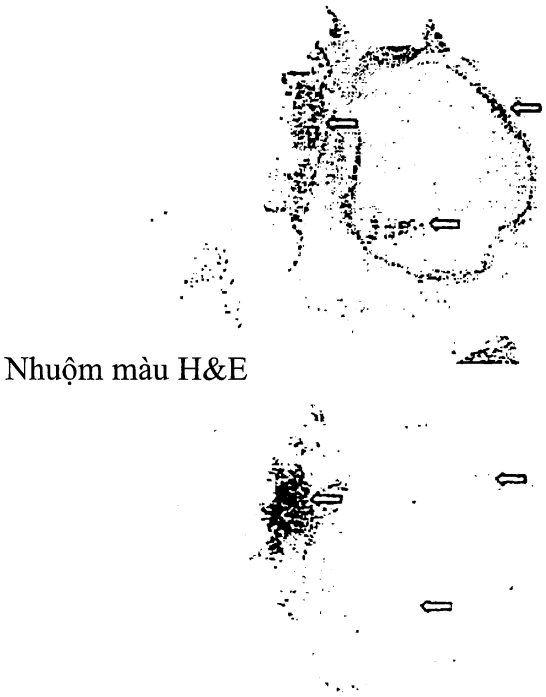

U87MG-
Δ2-7
A431
mAb 806
sc-03
IgG2b
mAb 806
sc-03
IgG2b
EGFR
de2-7 EGFR

FIG. 22



Nhuộm màu H&E

Phóng xạ chụp tự động

FIG. 23

FIG. 24A

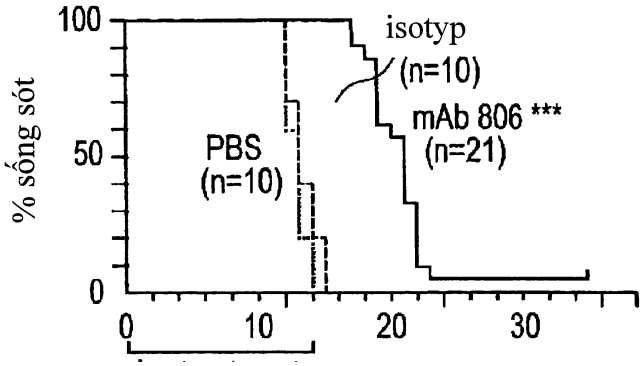


FIG. 24B

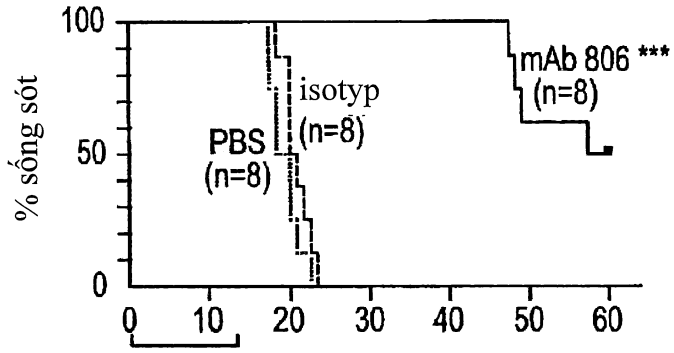


FIG. 24E

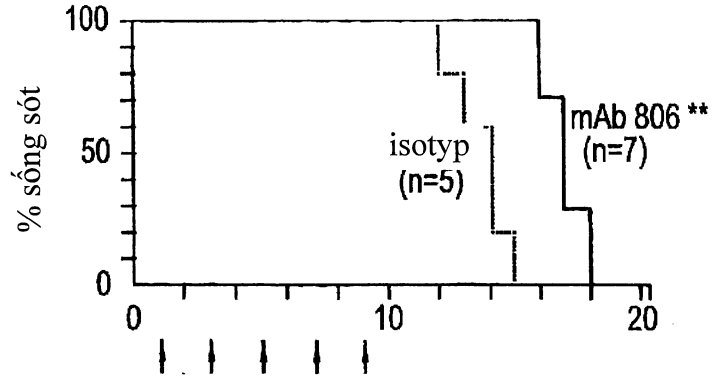


FIG. 24C

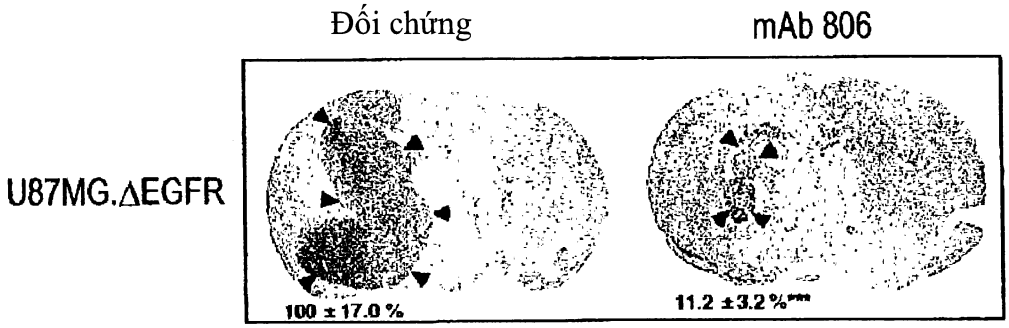


FIG. 24D

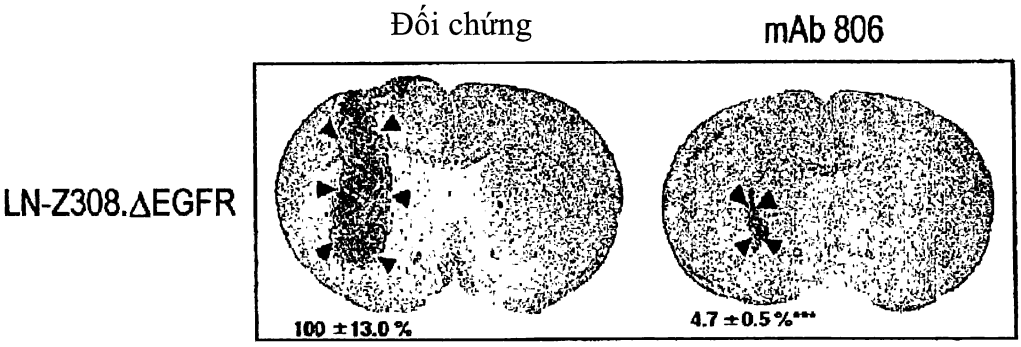


FIG. 25A

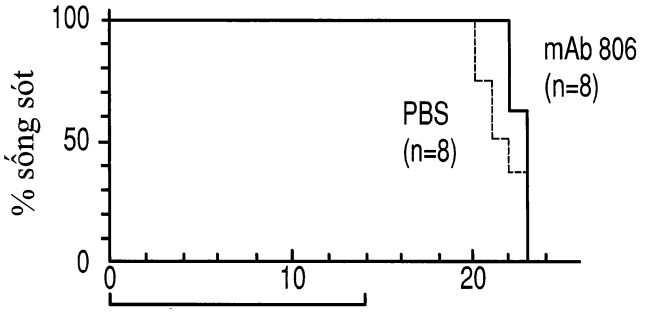


FIG. 25B

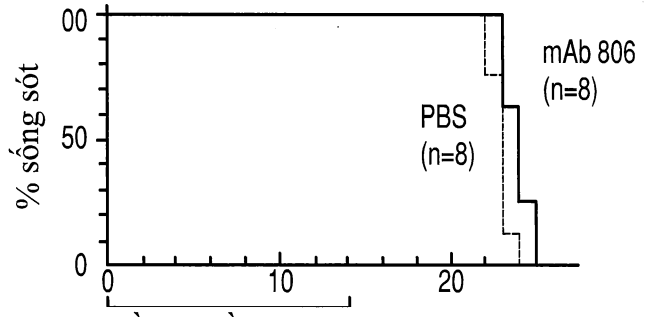
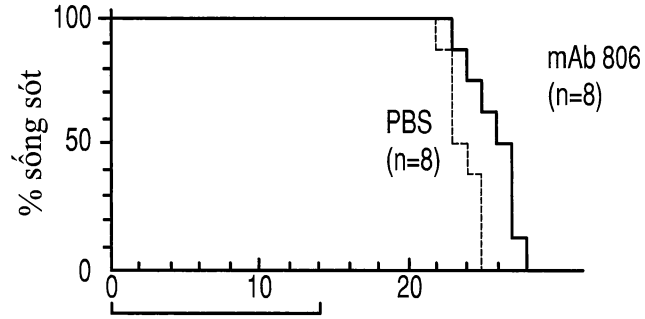
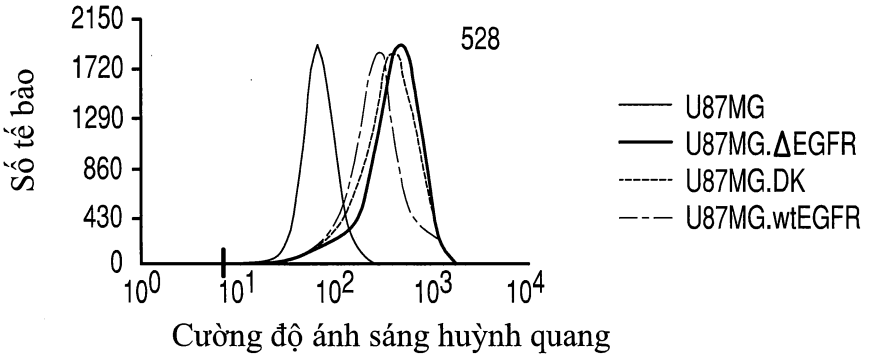


FIG. 25C





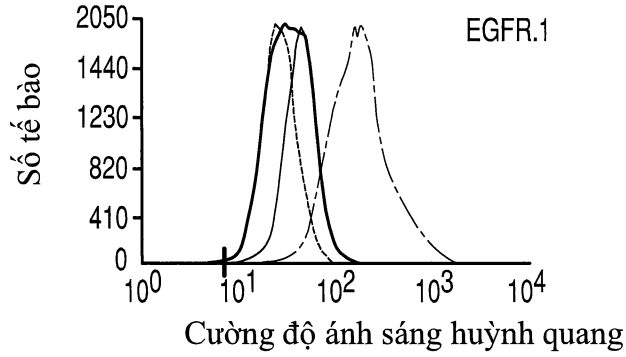
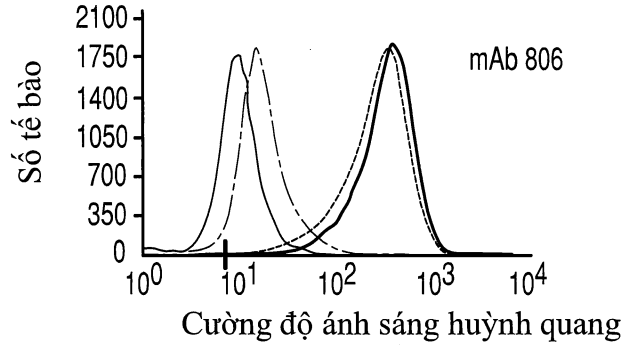


FIG. 26A



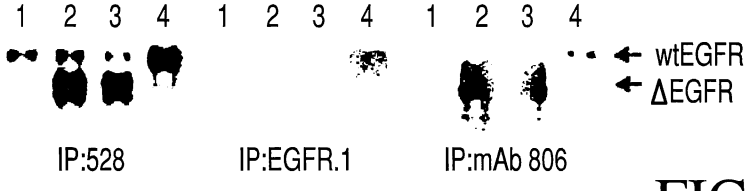


FIG. 26B

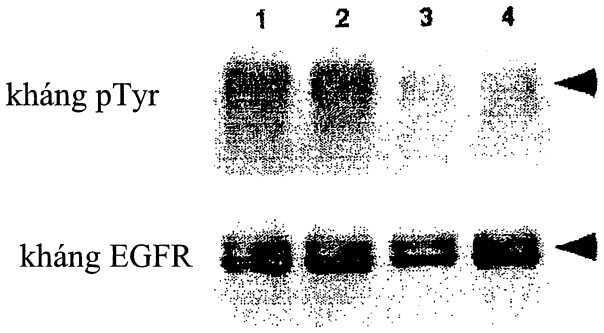


FIG.27A

FIG.27B

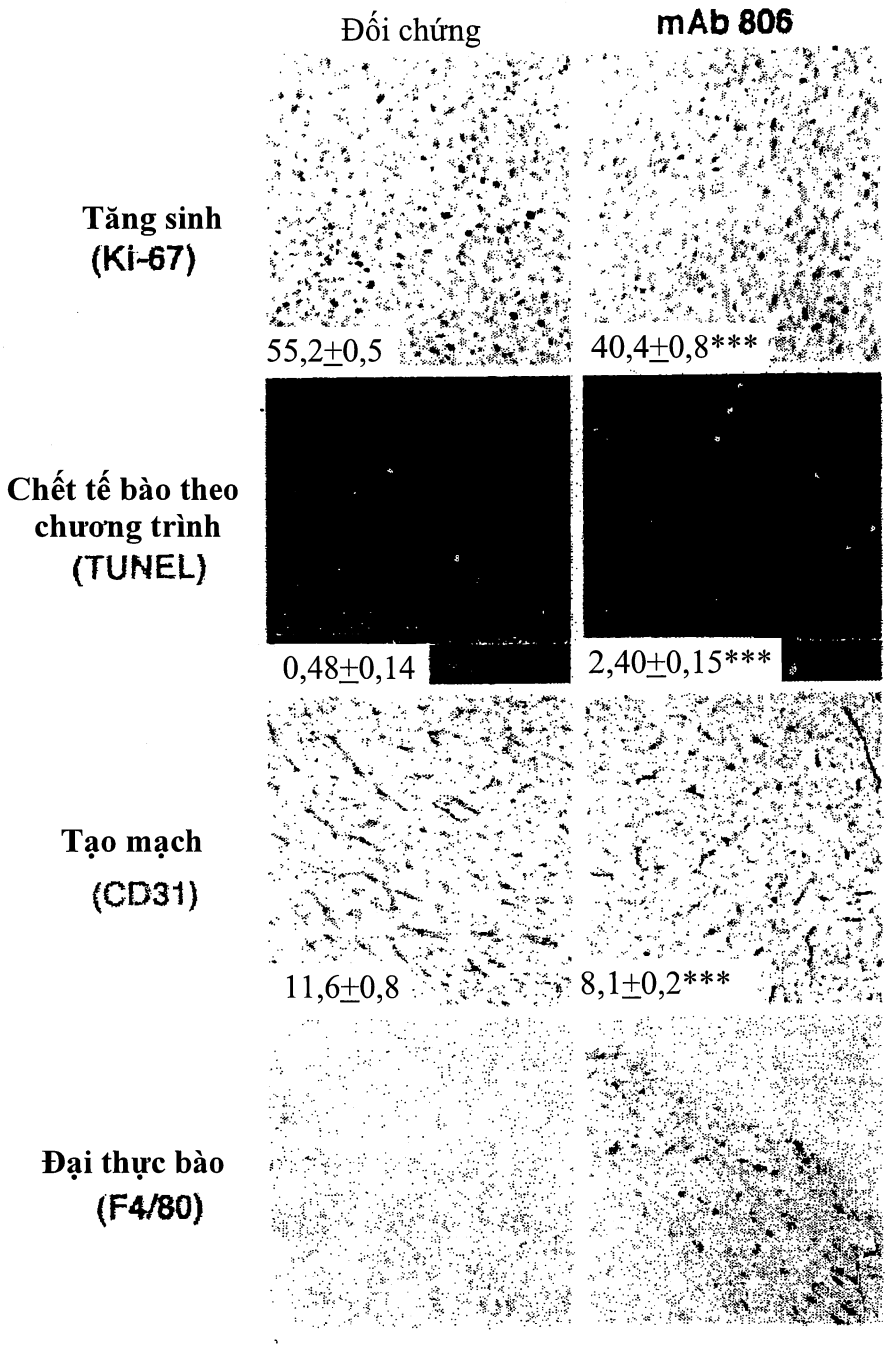

Đối chứng
mAb 806
Tăng sinh
(Ki-67)
55,2±0,5
40,4±0,8***
Chết tế bào theo
chương trình
(TUNEL)
0,48±0,14
2,40±0,15***
Tạo mạch
(CD31)
11,6±0,8
8,1±0,2***
Đại thực bào
(F4/80)

FIG.28

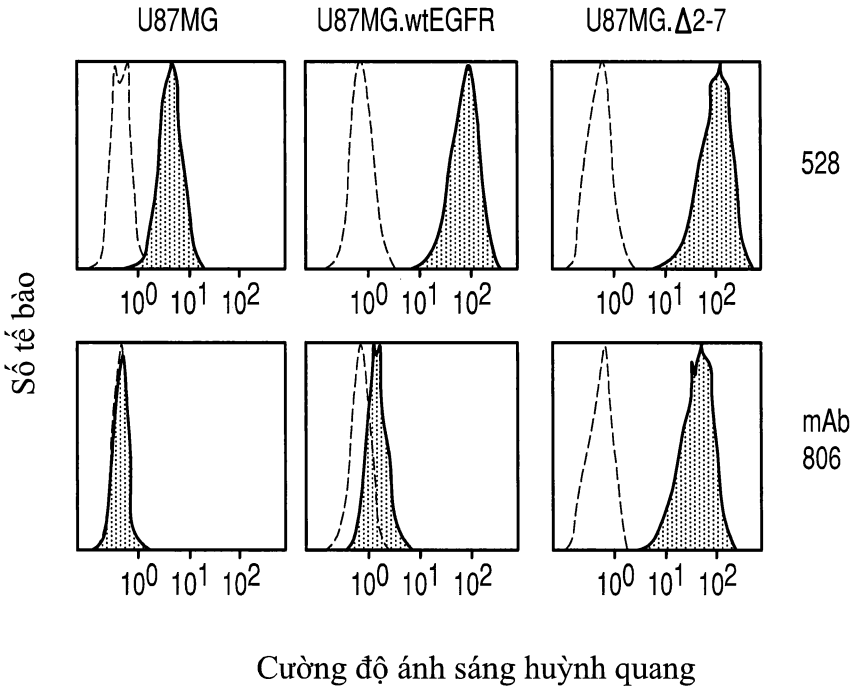

U87MG
U87MG.wtEGFR
U87MG.Δ2-7
528
mAb 806
Số tế bào
10^0 10^1 10^2
Cường độ ánh sáng huỳnh quang

FIG. 29

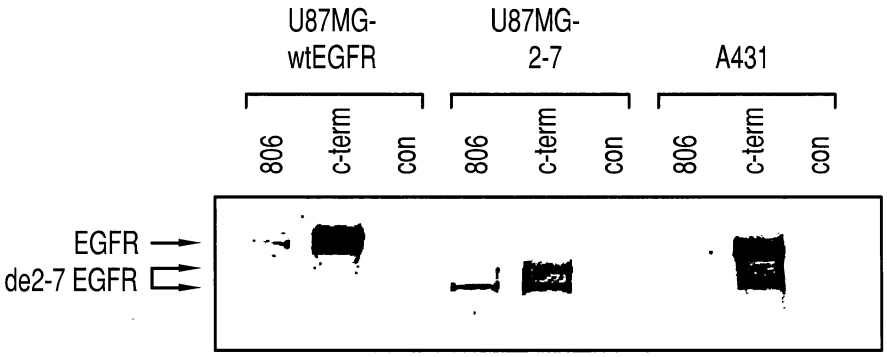

U87MG-
wtEGFR
U87MG-
2-7
A431
806
c-term
con
806
c-term
con
806
c-term
con
EGFR
de2-7 EGFR

FIG. 30

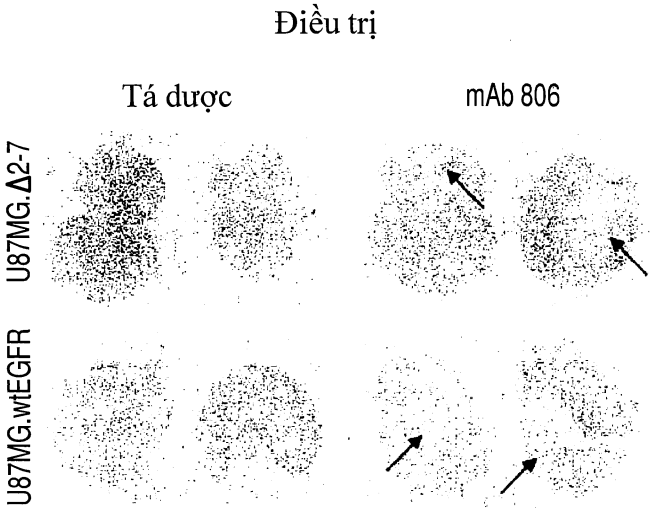


FIG. 31

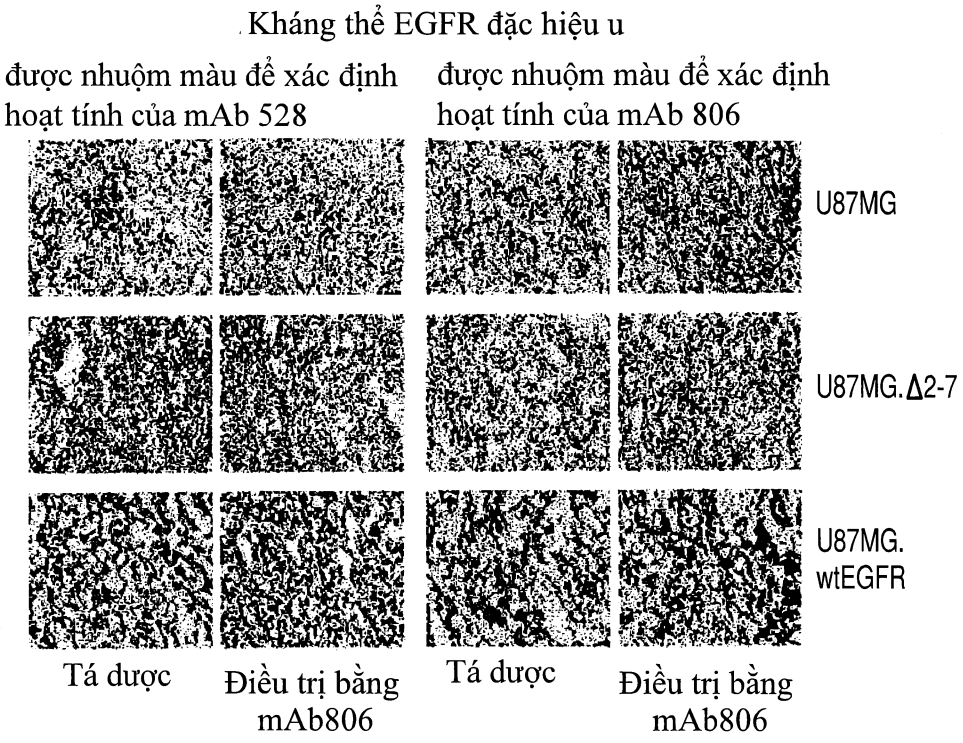

Kháng thể EGFR đặc hiệu u
được nhuộm màu để xác định hoạt tính của mAb 528
được nhuộm màu để xác định hoạt tính của mAb 806
U87MG
U87MG.Δ2-7
U87MG. wtEGFR
Tá dược
Điều trị bằng mAb806
Tá dược
Điều trị bằng mAb806

FIG. 32

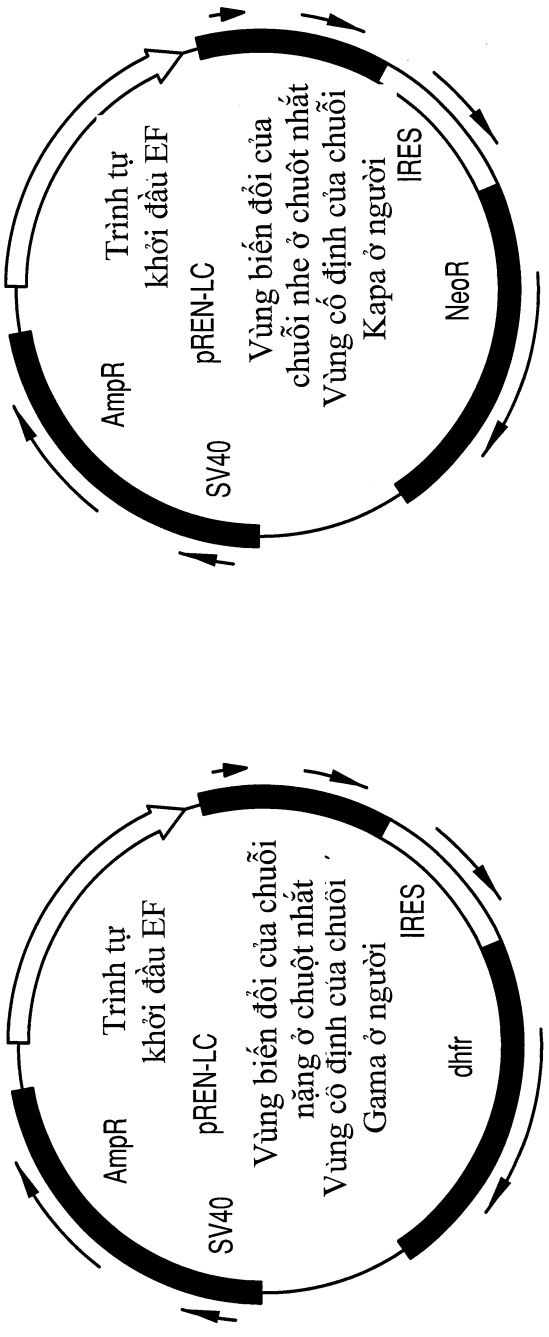

AmpR
Trình tự khởi đầu EF
pREN-LC
Vùng biến đổi của chuỗi nặng ở chuột nhắt
Vùng cố định của chuỗi Gama ở người
IRES
dhfr
SV40
AmpR
Trình tự khởi đầu EF
pREN-LC
Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ ở chuột nhắt
Vùng cố định của chuỗi Kapa ở người
IRES
NeoR
SV40

FIG. 33

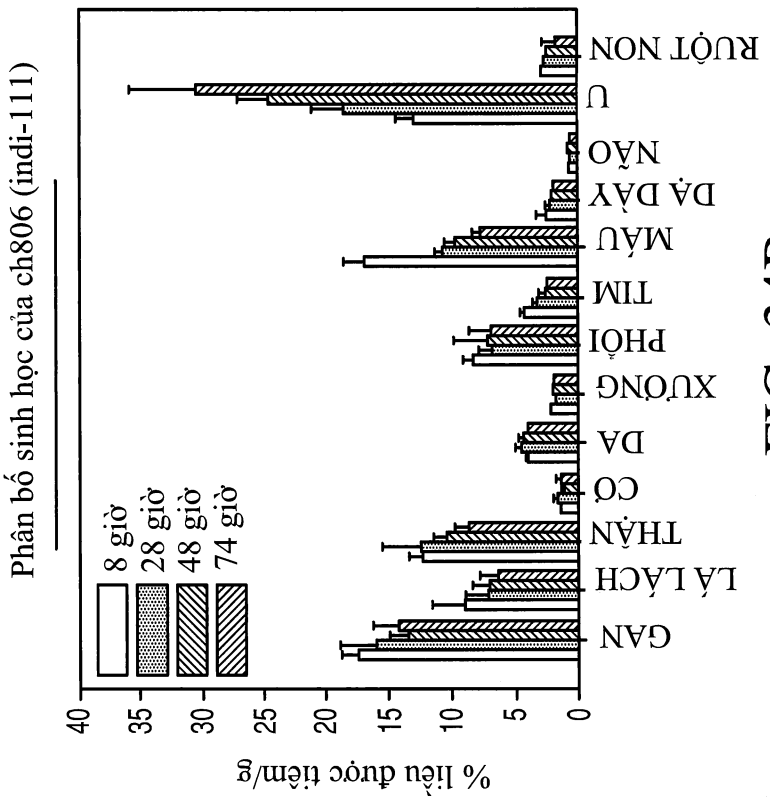


FIG. 34B

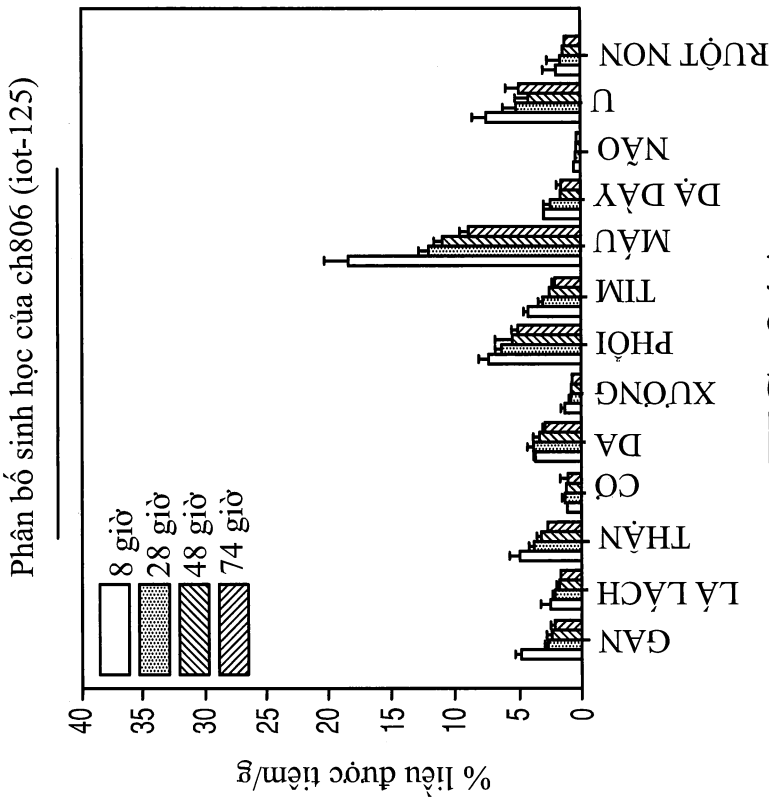


FIG. 34A

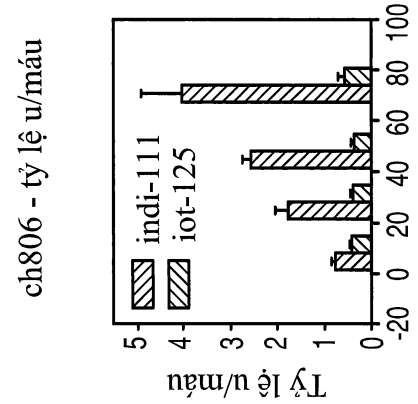


FIG. 35B

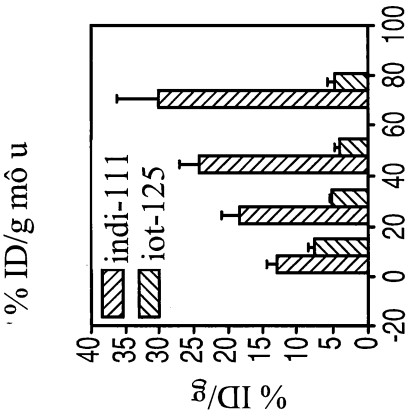


FIG. 35A

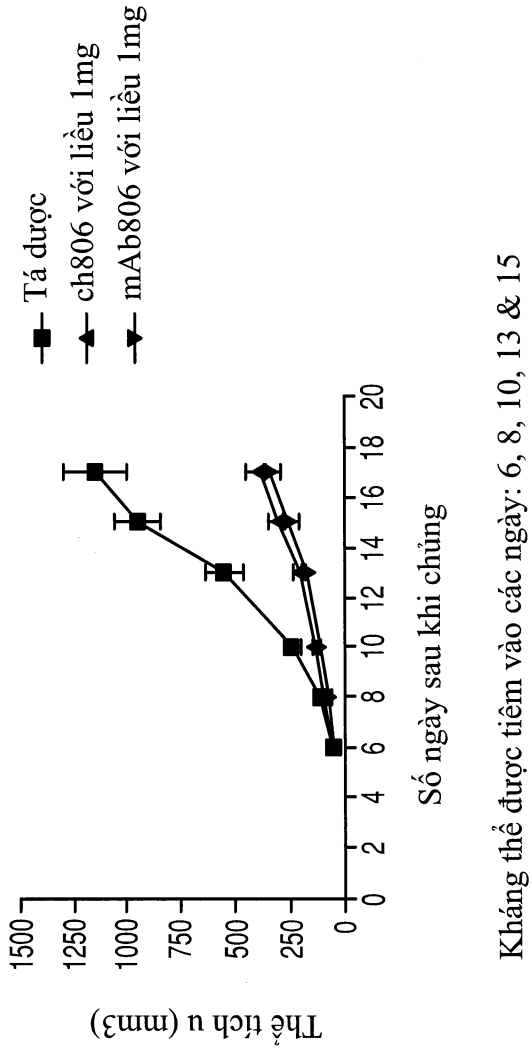

Tá dược
ch806 với liều 1mg
mAb806 với liều 1mg
Thể tích u (mm3)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Số ngày sau khi chủng
Kháng thể được tiêm vào các ngày: 6, 8, 10, 13 & 15

FIG. 36

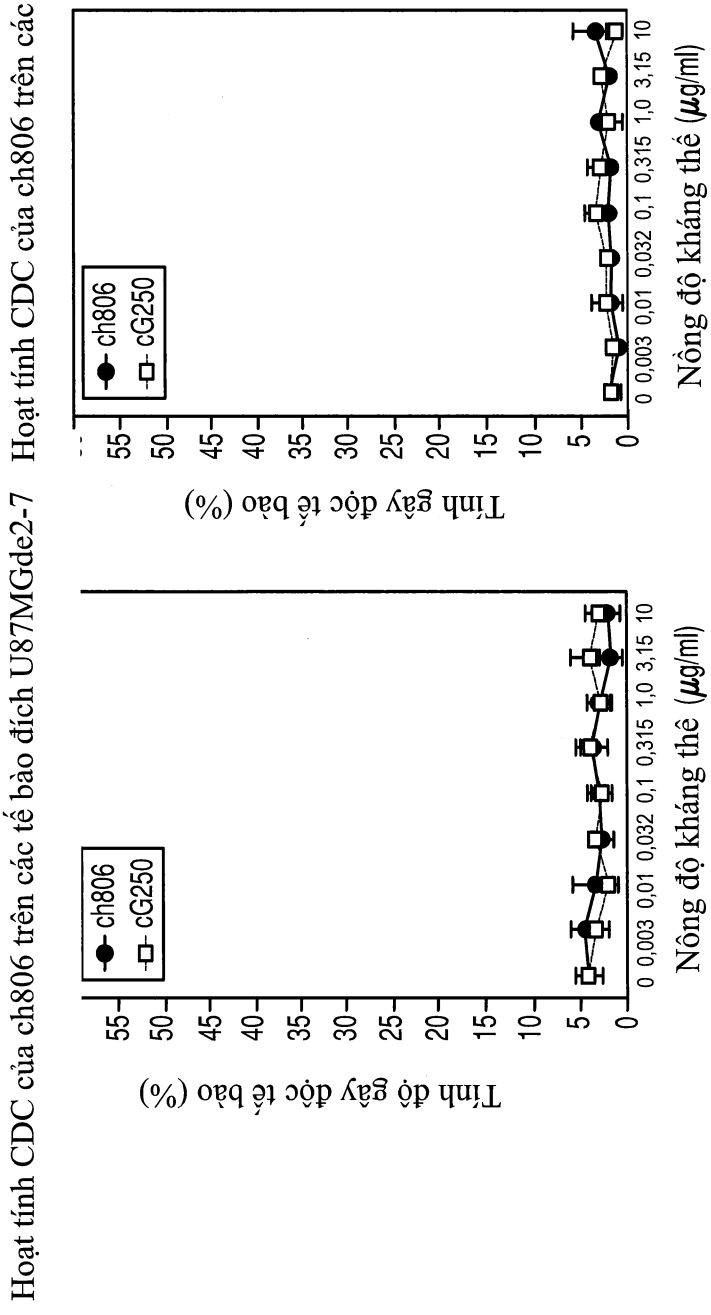

Hoạt tính CDC của ch806 trên các tế bào đích U87MGde2-7
Tính độ gây độc tế bào (%)
ch806
cG250
0 0,003 0,01 0,032 0,1 0,315 1,0 3,15 10
Nồng độ kháng thể (µg/ml)
Hoạt tính CDC của ch806 trên các tế bào đích A431
Tính gây độc tế bào (%)
ch806
cG250
0 0,003 0,01 0,032 0,1 0,315 1,0 3,15 10
Nồng độ kháng thể (µg/ml)

FIG. 37

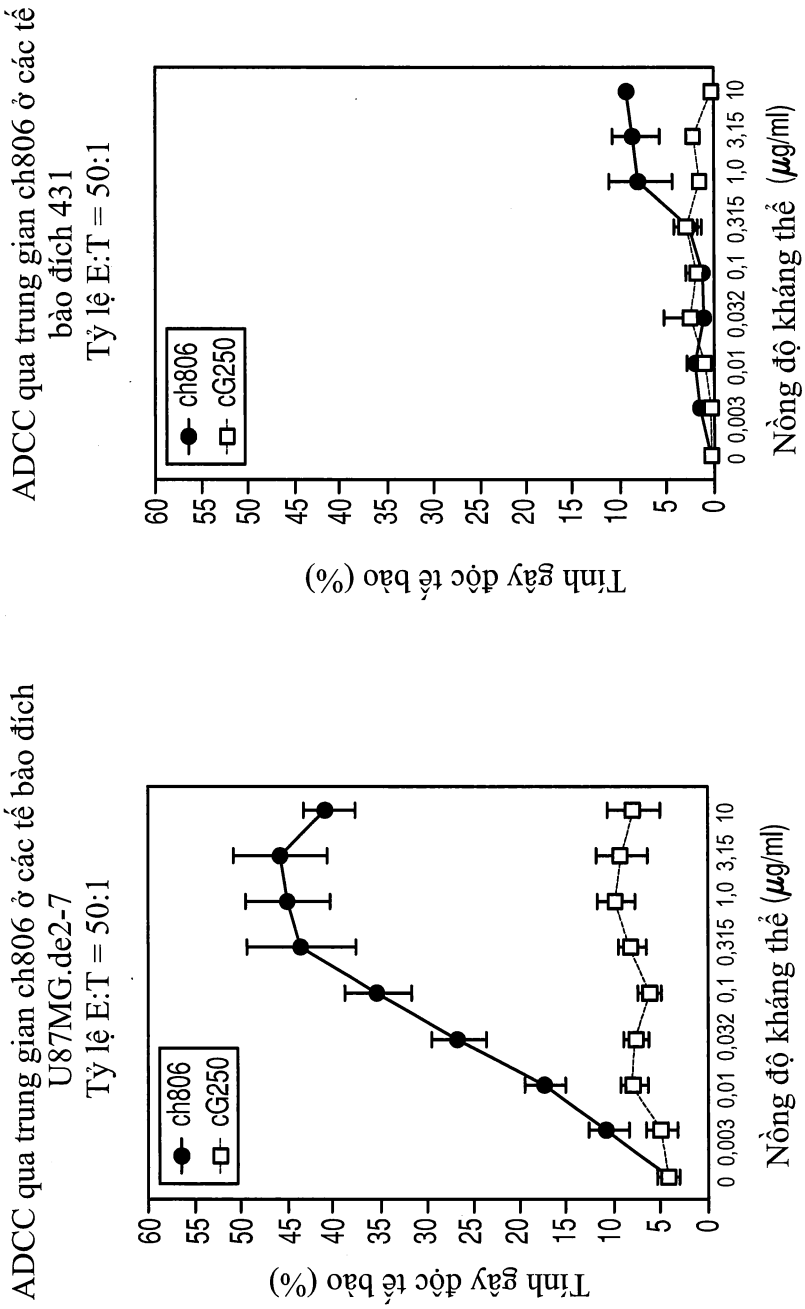

ADCC qua trung gian ch806 ở các tế bào đích U87MG.de2-7
Tỷ lệ E:T = 50:1
ch806
cG250
Tính gây độc tế bào (%)
Nồng độ kháng thể (µg/ml)
0 0,003 0,01 0,032 0,1 0,315 1,0 3,15 10
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
ADCC qua trung gian ch806 ở các tế bào đích 431
Tỷ lệ E:T = 50:1
ch806
cG250
Tính gây độc tế bào (%)
Nồng độ kháng thể (µg/ml)
0 0,003 0,01 0,032 0,1 0,315 1,0 3,15 10
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

FIG. 38

ADCC qua trung gian ch806 với nồng độ 1microgam/ml ở các tế bào đích U87MG.de2-7 với các tỷ lệ E:T khác nhau

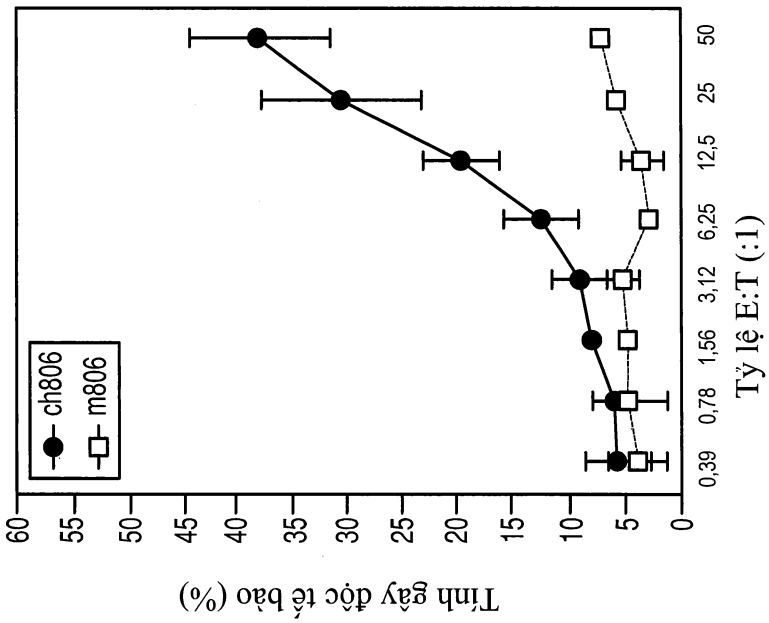


FIG. 39

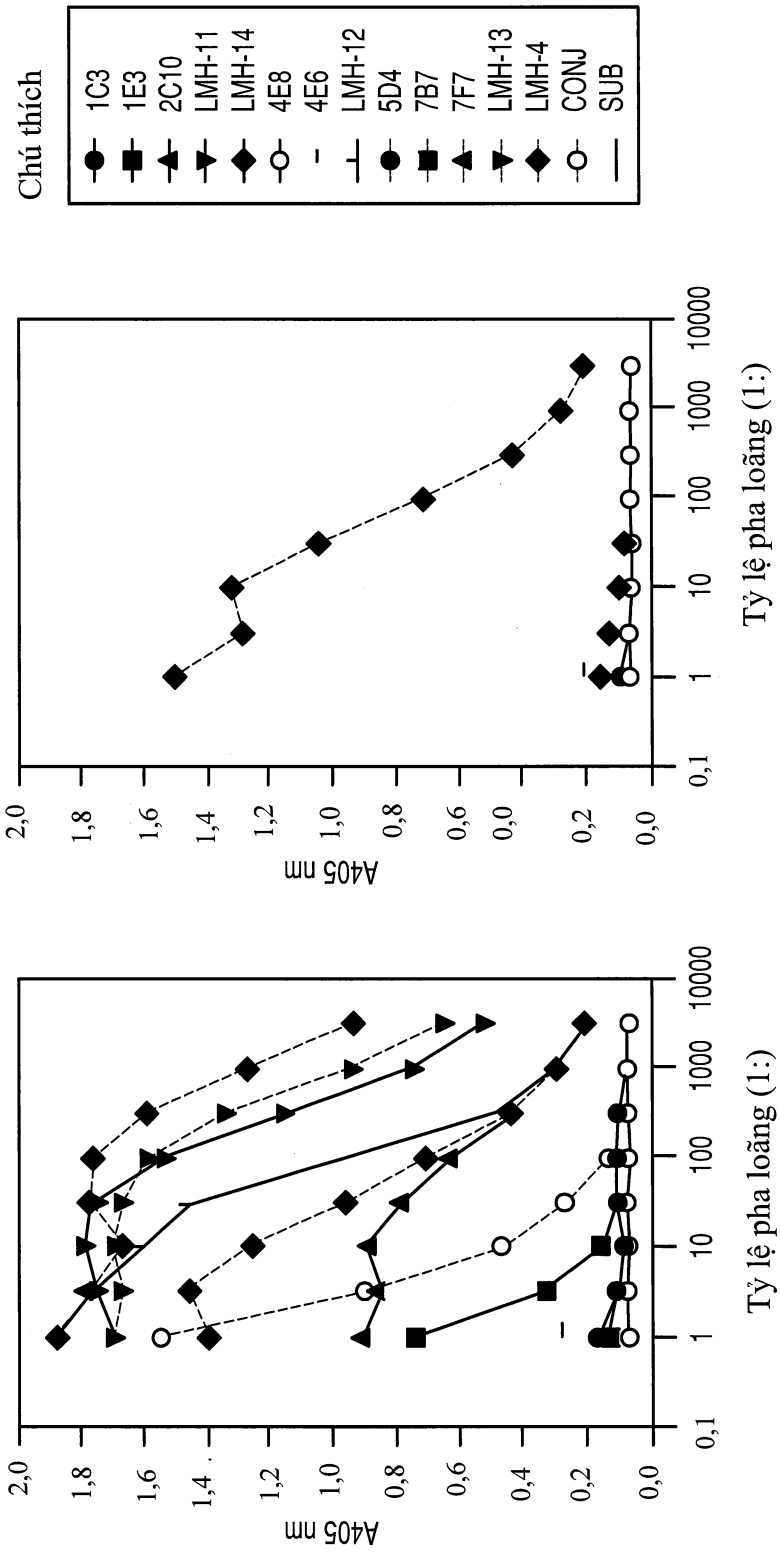

Chú thích
1C3
1E3
2C10
LMH-11
LMH-14
4E8
4E6
LMH-12
5D4
7B7
7F7
LMH-13
LMH-4
CONJ
SUB
A405 nm
Tỷ lệ pha loãng (1:)
A405 nm
Tỷ lệ pha loãng (1:)

FIG. 40

FIG. 41A

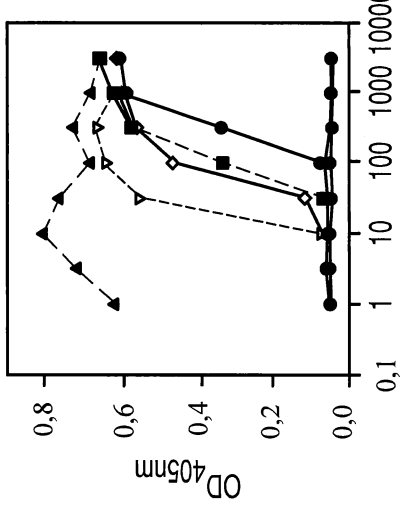


FIG. 41B

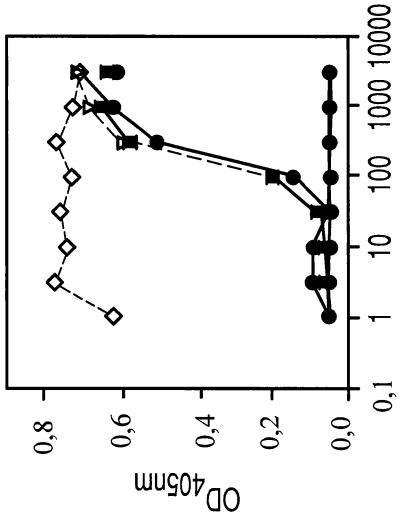
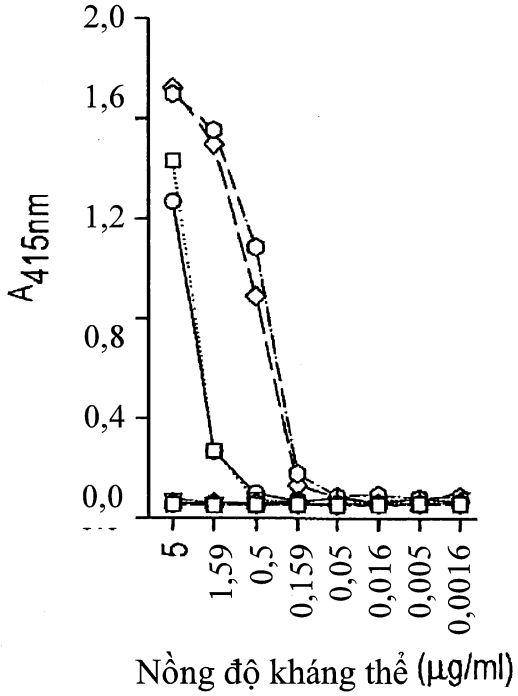


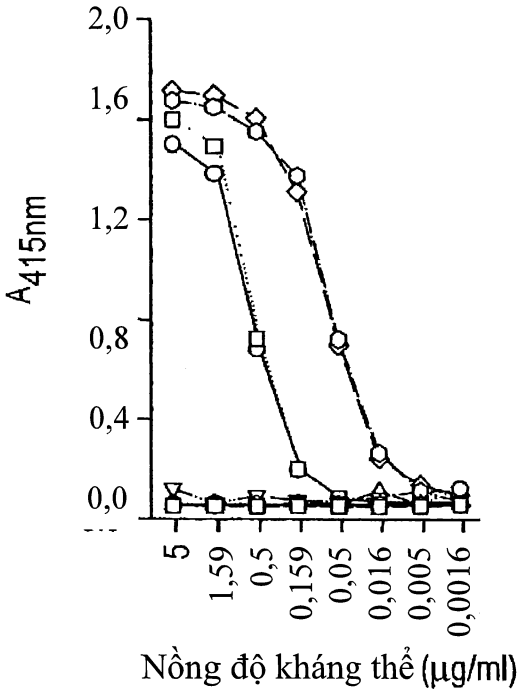
FIG. 41C

FIG. 42A



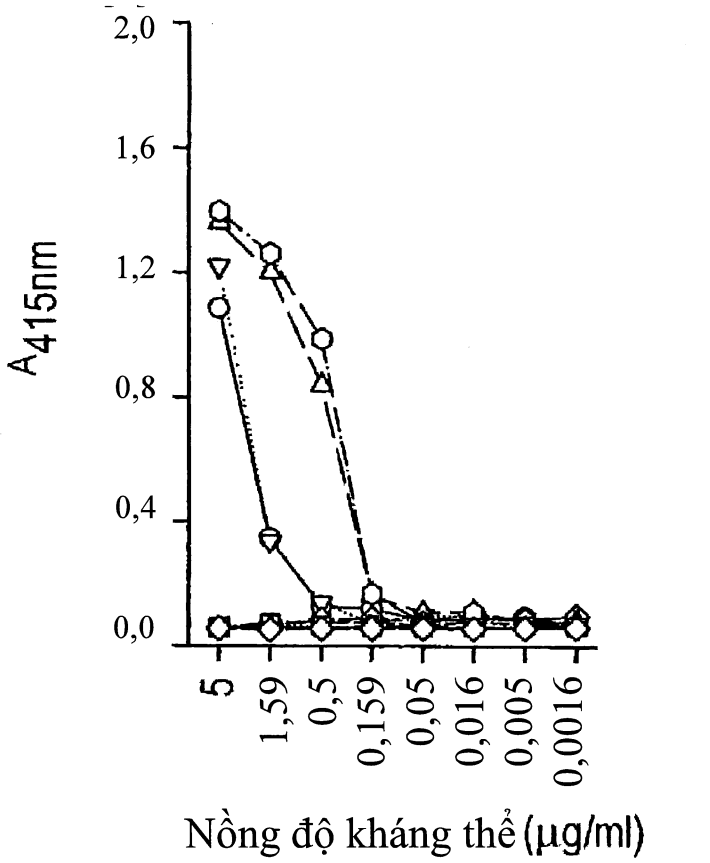
ch806- Huyết thanh
ch806-1%FCS /Môi trường
h3S193- Huyết thanh
h3S193-1%FCS/ Môi trườngM
m806- Huyết thanh
m806-1%FCS/ Môi trường
m3S193- Huyết thanh
m3S193-1%FCS/ Môi trường M
Avidin-HRP
Cơ chất ABTS

FIG. 42B



ch806- Huyết thanh
ch806-1%FCS/ Môi trường M
h3S193- Huyết thanh
h3S193-1%FCS /Môi trường M
m806- Huyết thanh
m806-1%FCS /Môi trường
m3S193- Huyêt thanh
m3S193-1%FCS/ Môi trường M
Avidin-HRP
Cơ chất ABTS

FIG. 42C


2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
A415nm
5
1,59
0,5
0,159
0,05
0,016
0,005
0,0016
Nồng độ kháng thể (µg/ml)
ch806- Huyết thanh
ch806-1%FCS /Môi trường
h3S193- Huyết thanh
h3S193-1%FCS /Môi trường M
m806- Huyết thanh
m806-1%FCS /Môi trường
m3S193- Huyết thanh
m3S193-1%FCS /Môi trường M
Avidin-HRP
Cơ chất ABTS

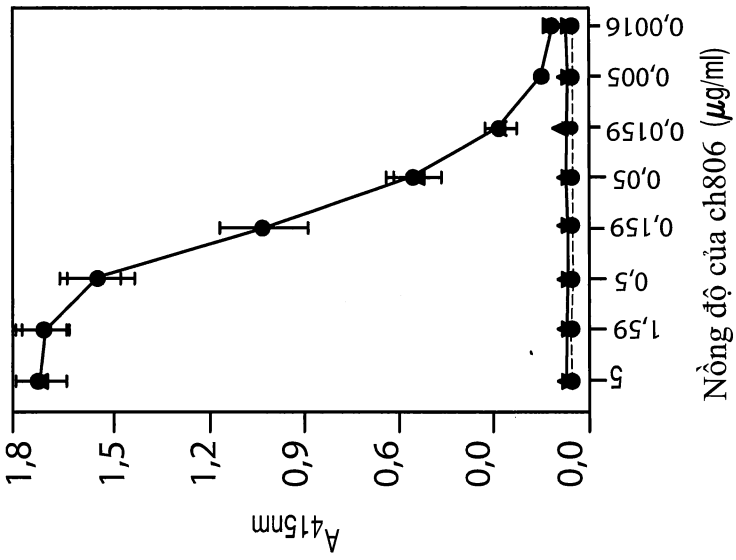

A415nm
1,8
1,5
1,2
0,9
0,6
0,0
0,0
5
1,59
0,5
0,159
0,05
0,0159
0,005
0,0016
Nồng độ của ch806 (µg/ml)

FIG. 43

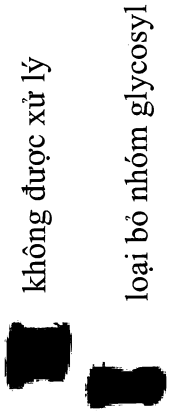


FIG. 44

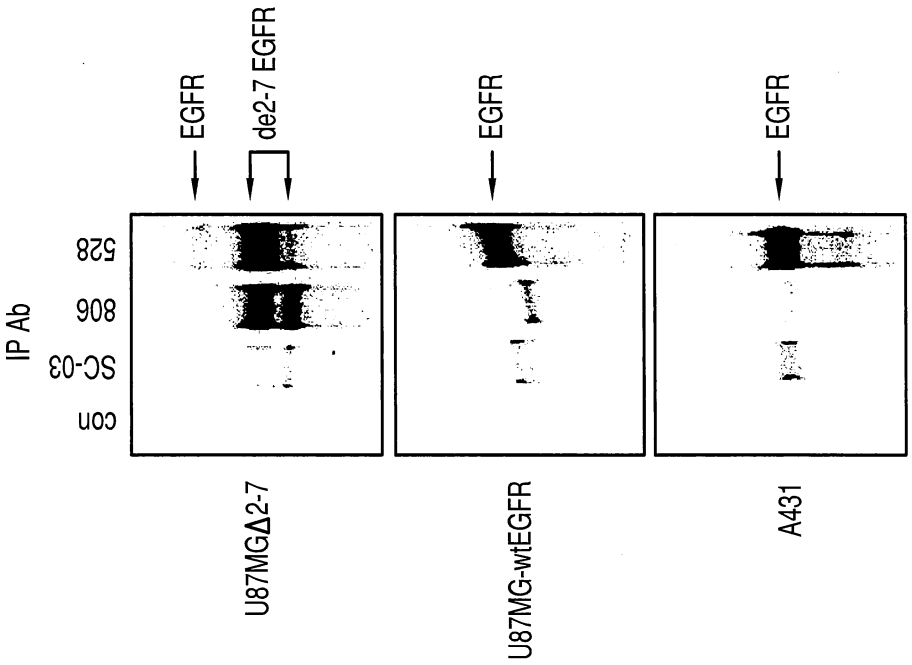

EGFR
de2-7 EGFR
EGFR
EGFR
IP Ab
528
806
SC-03
con
U87MGΔ2-7
U87MG-wtEGFR
A431

FIG. 45

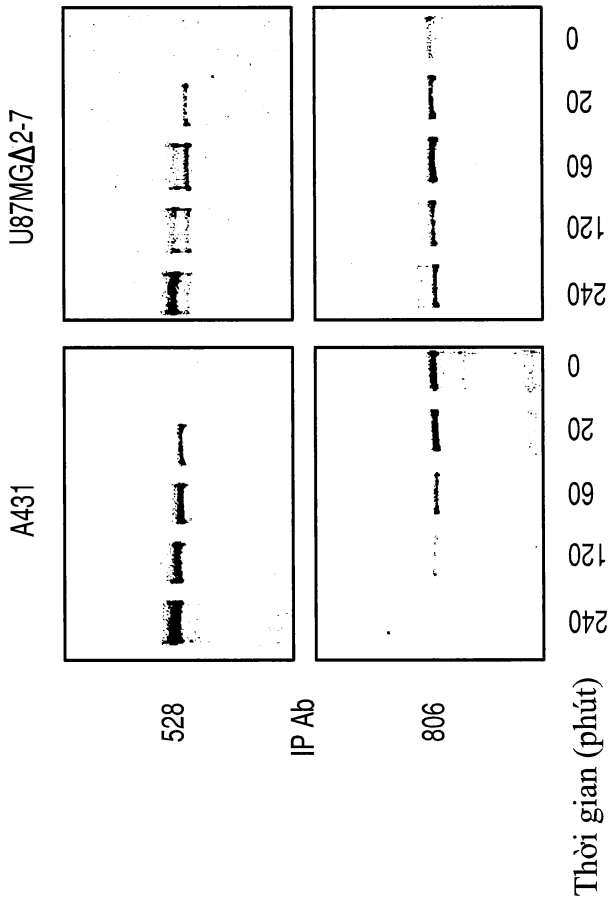


FIG. 46

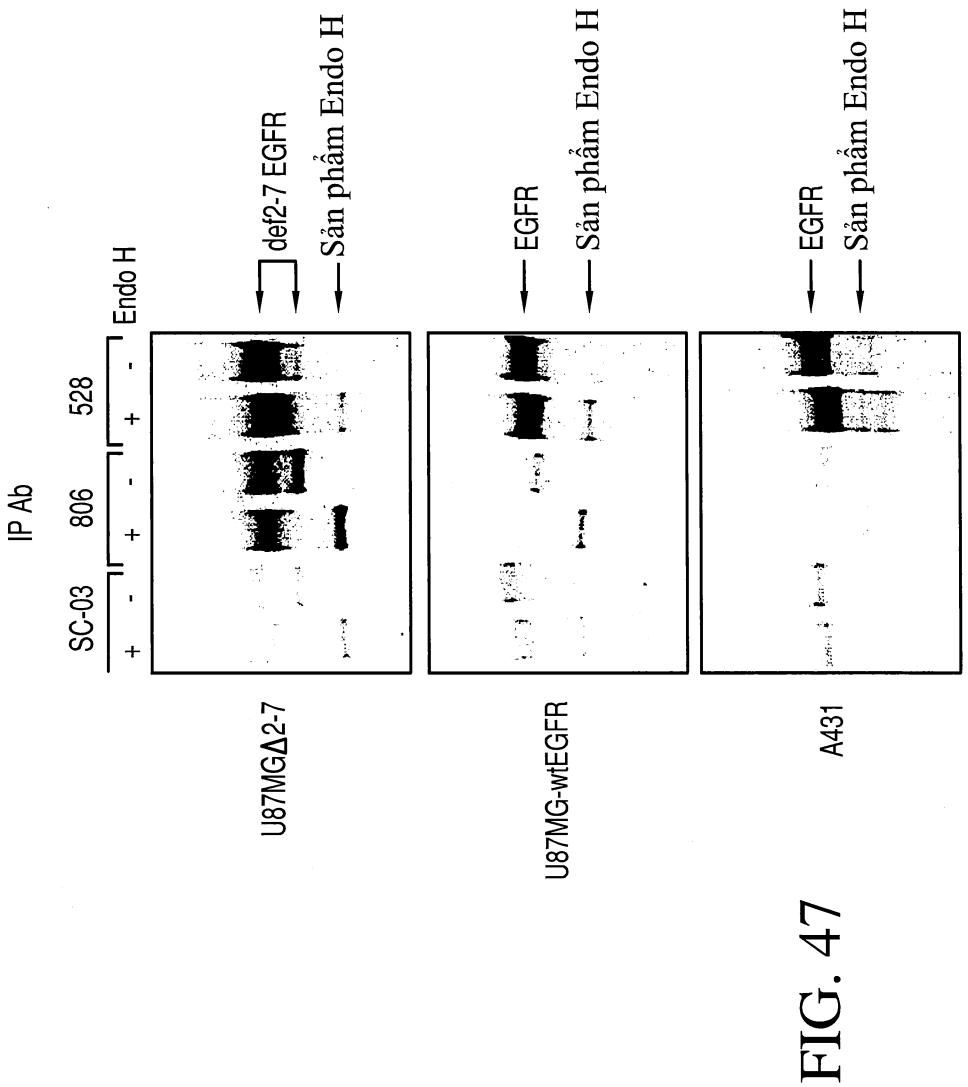

IP Ab
SC-03
806
528
Endo H
+
-
+
-
+
-
def2-7 EGFR
Sản phẩm Endo H
EGFR
Sản phẩm Endo H
EGFR
Sản phẩm Endo H
U87MGΔ2-7
U87MG-wtEGFR
A431

FIG. 47

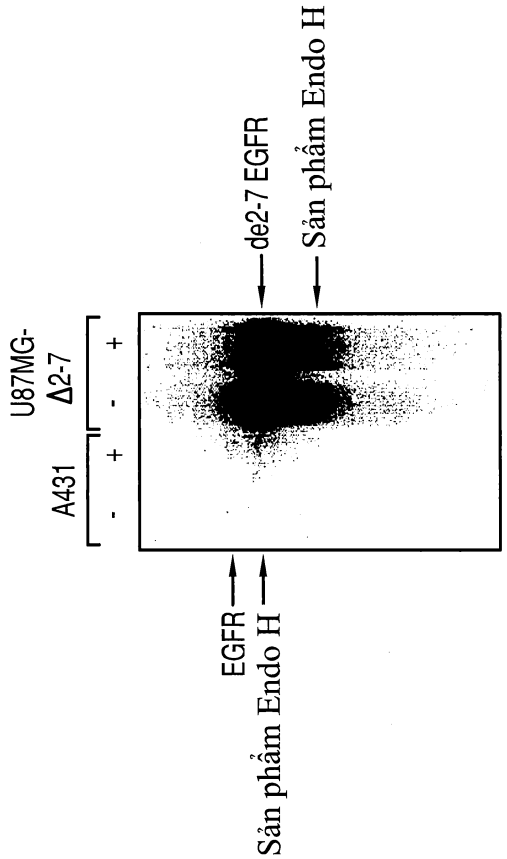


FIG. 48

SEQ ID NO:7 Vecto pREN ch806 LC Neo

Xho I

1 CTCGAGAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC

51 ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGT

EcoRI EF1α đoạn khởi đầu

101 GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGAATTCGTGAGGCTCCGGT

151 GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG

201 GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAA

251 ACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGG

301 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA

351 CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGC

401 CTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACG

451 CCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG

501 GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCT

551 TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG

601 GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA

651 ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA

701 AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGG

751 CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCC

801 TGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG

851 CCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC

901 GGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC

951 TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA

1001 GAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC

FIG.49

FIG.49 (tiếp theo)

```
          S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K  V  Q

1976 AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC
       W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V

2026 ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC
      T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T

2076 GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
       L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T

2126 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
       H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G  E
            Nhe/Xba
2176 TGTTGAGCTAGAACTAACTAACTAAGCTAGCAACGGTTTCCCTCTAGCGG
      C  *
2226 GATCAATTCCGCCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAA

2276 TAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTC

2326 TTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCA

2376 TTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAAT

2426 GTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTC

2476 TGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCC

2526 TCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAA

2576 CCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCT

2626 CTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCC

2676 ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACGTGTGTT

2751  TAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTT

2801  TTCCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTTGAACAAGATGGATTGCACG

2851  CAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA

2901  CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCA

2951  GGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
```

FIG.49 (tiếp theo)

```
3001  AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTT
3051  CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT
3101  GCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTC
3151  CTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG
3201  CTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGA
3251  GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG
3301  ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAG
3351  GCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTG
3401  CTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACT
3451  GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
3501  CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGT
3551  GCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC
                          đầu bằng SalI/SalI
3601  TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCGATCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
3651  CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGG
3701  GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
3751  CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTT
3801  TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTA
3851  AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
3901  CCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCT
3951  GATAGACGGTTTTTCGCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
4001  GACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTTA
4051  TAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
4101  ACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGT
4151  GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATATTTGTTTATTTTTC
```

FIG.49 (tiếp theo)

4201 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT

4251 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG

4301 TCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTACTGTTTTTGCTCAC

4351 CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG

4401 AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT

4451 TTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA

4501 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCG

4551 CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAG

4601 AAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC

4651 ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG

4701 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA

4751 CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC

4801 GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACT

4851 ATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT

4901 GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG

4951 GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG

5001 CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG

5051 TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG

5101 ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA

5151 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTA

5201 AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT

5251 TAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA

5301 AGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCACGTAATCTGCTGCTTGCAAA

FIG.49 (tiếp theo)

5351 CAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTAC

5401 CAACTCTTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAT

5451 ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT

5501 AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG

5551 CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTA

5601 CCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC

5651 CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC

5701 TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG

5751 GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG

5801 AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG

5851 AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC

5901 GCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGC

5951 TCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA

6001 CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGC

6051 AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCC

6101 TCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGTATCACGAGGCCCTTT

6151 CGTCTTCAC

FIG.49 (tiếp theo)

SEQ ID NO:8 Vecto pREN ch806 HC DHFR

Xho I

1 CTCGAGAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC

52 ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGT

EcoRI EF1α đoạn khởi đầu

102 GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGAATTCGTGAGGCTCCGGT

152 GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG

202 GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAA

252 ACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGG

302 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA

352 CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGC

402 CTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACG

452 CCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG

502 GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCT

552 TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG

602 GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA

652 ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA

702 AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGG

752 CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCC

802 TGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG

852 CCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC

902 GGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC

952 TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA

1002 GAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC

FIG.50

```
1052   AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC

1102   TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAG

1152   GGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGT

1202   TAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTG

1251   AGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTT
                              MluI          HindIII     PmeI
1302   TTTCTTCCATTTCAGGTGTACGCGTCTCGGGAAGCTTTAGTTTAAACGCC

1352   GCCACCATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTCACAGCCTTTCCTGGT
             M  R  V  L  I  L  L  W  L  F  T  A  F  P  G

1401   GTCCTGTCTGATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCT
             V  L  S  D  V  Q  L  Q  E  S  G  P  S  L  V  K  P

1451   TCTCAGACTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGT
       S  Q  T  L  S  L  T  C  T  V  T  G  Y  S  I  T  S

1501   GATTTTGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGG
       D  F  A  W  N  W  I  R  Q  F  P  G  N  K  L  E  W

1551   ATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAA
       M  G  Y  I  S  Y  S  G  N  T  R  Y  N  P  S  L  K

1601   AGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATTCTTCCTGCAG
       S  R  I  S  I  T  R  D  T  S  K  N  Q  F  F  L  Q

1651   TTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCG
         L  N  S  V  T  I  E  D  T  A  T  Y  Y  C  V  T  A

1701   GGACGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
       G  R  G  F  P  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A

                    BamHI
1751   CAGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC

1801   CCACACCGCGGTCACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGC
                                                S  T  K  G
1851   CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
p  s  v  f  p  l  a  p  s  s  k  s  t  s  g  g  t
```

FIG.50 (tiếp theo)

```
1901  AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
        A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V

1951  TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT
  s  w  n  s  g  a  l  t  s  g  v  h  t  f  p  a

2001  GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
v  l  q  s  s  g  l  y  s  l  s  s  v  y  s  v  p

2051  CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
        S  S  S  L  G  T  Q  T  Y  I  C  N  V  N  H  K  P

2101  CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
        S  N  T  K  V  D  K  K  V  E  P  K  S  C  D  K

2151  ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
        T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S

2201  AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA
        V  F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T

2251  CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
        P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  H  E  D  P  E

2301  GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAACGCCAAGAC
        V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T

2351  AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC
        K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L

2401  TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
        T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K

2451  GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
        V  S  N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A

2501  CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
        K  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  E

2551  AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
        E  M  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F

2601  TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
        Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N

2651  CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
```

FIG.50 (tiếp theo)

```
          N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L

2701  TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
        Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V

2751  TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
      F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K
                                                Nhe/Xba
2801  GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGAAACTAACTAAGCTAGC
        S  L  S  L  S  P  G  K  *
2851  AACGGTTTCCCTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCCCCCCCCCTAACGTTAC

2901  TGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT

2951  TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC

3001  CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGG

3051  AATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTT

3101  CTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCC

3151  CCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAC

3201  ACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG

3251  TGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG

3301  GATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTG

3351  CACATGCTTTACGTGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCC

3401  GAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTT

3451  CGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAAATATGGGGATTGGCAA

3501  GAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCC

3551  AAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATT

3601  ATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAA

3651  GGACAGAATTAATGGTTCGATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACC

3701  ACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGAC

3751  TTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTC
```

FIG.50 (tiếp theo)

```
3801  GGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAG
3851  ACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCC
3901  CAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTC
3951  CTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTA
4001  CGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTCC
                                                  đầu bằng
SalI/SalI
4051  TAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGTCGATCGAC
4101  CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC
4151  GCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCG
4201  GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT
4251  AGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCG
4301  GCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
4351  AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
4401  ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCTTTGACGTTGGA
4451  GTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCA
4501  ACCCTATCTCGGTCTATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGG
4551  TTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATA
4601  TTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
4651  CCTATATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
4701  AGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
4751  GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTT
4801  GCCTTACTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT
4851  GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAG
4901  CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA
```

FIG.50 (tiếp theo)

4951 GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCC

5001 GGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT

5051 TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAA

5101 GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC

5151 TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA

5201 CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA

5251 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATG

5301 GCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC

5351 CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAC

5401 TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA

5451 GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG

5501 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTA

5551 TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG

5601 CATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT

5651 AAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA

5701 ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA

5751 GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCA

5801 CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTG

5851 TTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCA

5901 GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGC

5951 CACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT

6001 CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT

6051 TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG

FIG.50 (tiếp theo)

```
6101  GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
6151  GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA
6201  GAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC
6251  ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGG
6301  GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
6351  GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTG
6401  GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGA
6451  TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC
6501  GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
6551  CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
6601  CAGGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAC
```

FIG.50 (tiếp theo)

Chuỗi VH của mAb124: Trình tự axit nucleic và axit amin

A. Trình tự axit nucleic

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCT
ACTCAATCACCAGTGACTATGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAA
GTTACAGTGCTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATT
CTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTAC
TGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:21)

B. Trình tự axit amin

DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSANTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQL
CDR1 *CDR2*
NSVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:22)
CDR3

FIG.51

Chuỗi VL của mAb124: Trình tự axit nucleic và axit amin

C. Trình tự axit nucleic

GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTCTATCTCTGGGAGACACAGTCAGTATCACTTGCCATTCAAGTCA
GGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAA
CTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAA
TCTGAAGATTTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAA
TCAAACGG (SEQ ID NO:26)

D. Trình tự axit amin

DILMTQSPSSMSLSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFVD
CDR1 *CDR2*

YYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:27)
CDR3

FIG.51 (tiếp)

Chuỗi VH của mAb1133: Trình tự axit nucleic và axit amin

A. Trình tự axit nucleic

GATGTGCAGCTTCAGGGGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCT
ACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAA
GCTACAGTGGTAACACTAGATACAACCCATCTCTCAGAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATT
CTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGGCGGGACGCGGATTTCCTTAC
TGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:31)

B. Trình tự axit amin

DVQLQGSGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLRSRISITRDTSKNQFFLQL
CDR1 *CDR2*

NSVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:32)
CDR3

FIG.52

Chuỗi VL của mAb1133: Trình tự axit nucleic và axit amin

C. Trình tự axit nucleic

GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTGTCTCTGGGAGACACAGTCAACATCACTTGCCATTCAAGTC
AGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCA
ACTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGA
ATCTGAGGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA
ATCAAAC (SEQ ID NO:36)

D. Trình tự axit amin

DILMTQSPSSMSVSLGDTVNITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFA
CDR1 *CDR2*
DYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:37)
CDR3

FIG.52 (tiếp)

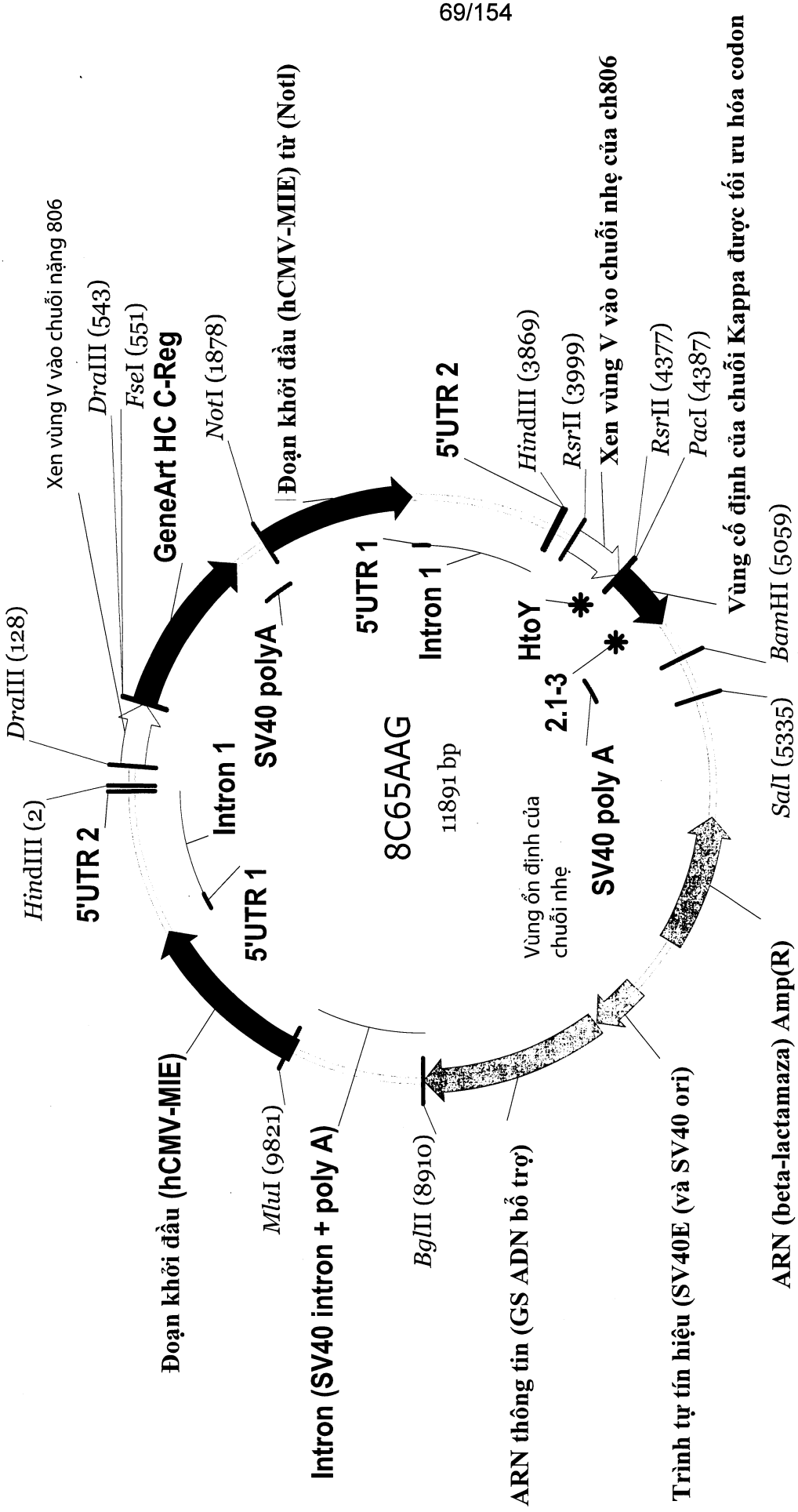

8C65AAG
11891 bp
Đoạn khởi đầu (hCMV-MIE) từ (NotI)
5'UTR 2
Intron 1
5'UTR 1
SV40 polyA
HtoY
2.1-3
SV40 poly A
Vùng ổn định của chuỗi nhẹ
Vùng cố định của chuỗi Kappa được tối ưu hóa codon
Xen vùng V vào chuỗi nhẹ của ch806
ARN (beta-lactamaza) Amp(R)
Trình tự tín hiệu (SV40E (và SV40 ori)
ARN thông tin (GS ADN bổ trợ)
Intron (SV40 intron + poly A)
Đoạn khởi đầu (hCMV-MIE)
Xen vùng V vào chuỗi nặng 806
GeneArt HC C-Reg
HindIII (2)
DraIII (128)
DraIII (543)
FseI (551)
NotI (1878)
MluI (9821)
BglII (8910)
SalI (5335)
BamHI (5059)
PacI (4387)
RsrII (3999)
HindIII (3869)

FIG.53

FIG. 54

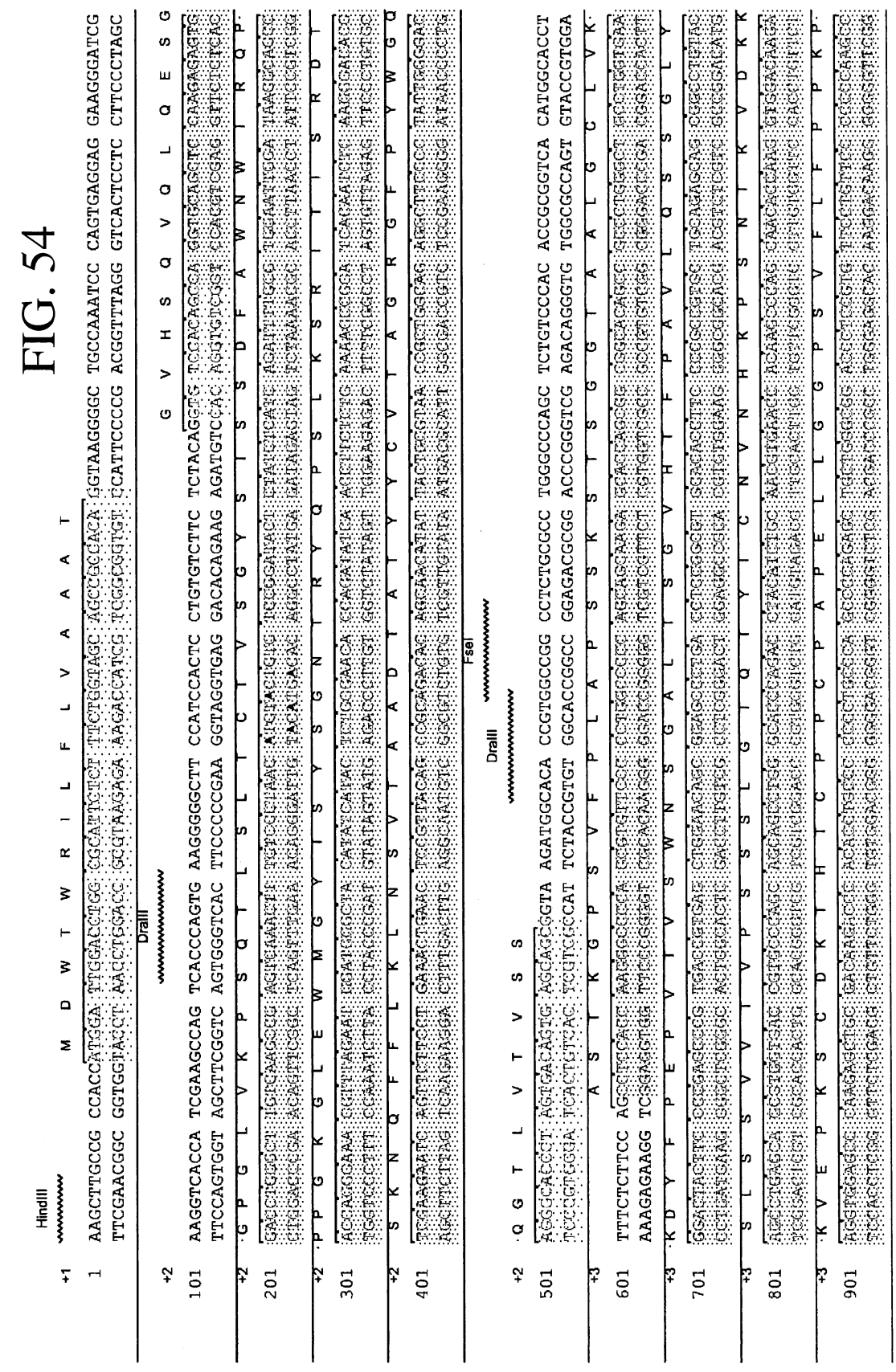


FIG. 54
(tiếp)

FIG. 54
(tiếp)

```
2301  TGTTGACATT GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA
      ACAACTGTAA CTAATAACTG ATCAATAATT ATCATTAGTT AATGCCCCAG TAATCAAGTA TCGGGTATAT ACCTCAAGGC GCAATGTATT GAATGCCATT

2401  ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA
      TACCGGGCGG ACCGACTGGC GGGTTGCTGG GGGCGGGTAA CTGCAGTTAT TACTGCATAC AAGGGTATCA TTGCGGTTAT CCCTGAAAGG TAACTGCAGT

2501  ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAACTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC
      TACCCACCTC ATAAATGCCA TTTGACGGGT GAACCGTCAT GTAGTTCACA TAGTATACGG TTCATGCGGG GGATAACTGC AGTTACTGCC ATTTACCGGG

2601  GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC
      CGGACCGTAA TACGGGTCAT GTACTGGAAT ACCCTGAAAG GATGAACCGT CATGTAGATG CATAATCAGT AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG

2701  AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG
      TCATGTAGTT ACCCGCACCT ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC

2801  GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCG TTTAGTGAAC
      CCTGAAAGGT TTTACAGCAT TGTTGAGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC CAGATATATT CGTCTCGAGC AAATCACTTG

                                                                                                  EagI
2901  CGTCAGATCG CCTGGAGACG CCATCCACGC TGTTTTGACC TCCATAGAAG ACACCGGGAC CGATCCAGCC TCCGCGGCCG GGAACGGTGC ATTGGAACGC
      GCAGTCTAGC GGACCTCTGC GGTAGGTGCG ACAAAACTGG AGGTATCTTC TGTGGCCCTG GCTAGGTCGG AGGCGCCGGC CCTTGCCACG TAACCTTGCG

3001  GGATTCCCCG TGCCAAGAGT GACGTAAGTA CCGCCTATAG AGTCTATAGG CCCACCCCCT TGGCTTCTTA TGCATGCTAT ACTGTTTTTG GCTTGGGGTC
      CCTAAGGGGC ACGGTTCTCA CTGCATTCAT GGCGGATATC TCAGATATCC GGGTGGGGGA ACCGAAGAAT ACGTACGATA TGACAAAAAC CGAACCCCAG

3101  TATACACCCC CGCTTCCTCA TGTTATAGGT GATGGTATAG CTTAGCCTAT AGGTGTGGGT TATTGACCAT TATTGACCAC TCCCCTATTG GTGACGATAC
      ATATGTGGGG GCGAAGGAGT ACAATATCCA CTACCATATC GAATCGGATA TCCACACCCA ATAACTGGTA ATAACTGGTG AGGGGATAAC CACTGCTATG

3201  TTTCCATTAC TAATCCATAA CATGGCTCTT TGCCACAACT CTCTTTATTG GCTATATGCC AATACACTGT CCTTCAGAGA CTGACACGGA CTCTGTATTT
      AAAGGTAATG ATTAGGTATT GTACCGAGAA ACGGTGTTGA GAGAAATAAC CGATATACGG TTATGTGACA GGAAGTCTCT GACTGTGCCT GAGACATAAA

3301  TTACAGGATG GGGTCTCATT TATTATTTAC AAATTCACAT ATACAACACC ACCGTCCCCA GTGCCCGCAG TTTTTATTAA ACATAACGTG GGATCTCCAC
      AATGTCCTAC CCCAGAGTAA ATAATAAATG TTTAAGTGTA TATGTTGTGG TGGCAGGGGT CACGGGCGTC AAAAATAATT TGTATTGCAC CCTAGAGGTG

3401  GCGAATCTCG GGTACGTGTT CCGGACATGG GCTCTTCTCC GGTAGCGGCG GAGCTTCTAC ATCCGAGCCC TGCTCCCATG CCTCCAGCGA CTCATGGTCG
      CGCTTAGAGC CCATGCACAA GGCCTGTACC CGAGAAGAGG CCATCGCCGC CTCGAAGATG TAGGCTCGGG ACGAGGGTAC GGAGGTCGCT GAGTACCAGC

3501  CTCGGCAGCT CCTTGCTCCT AACAGTGGAG GCCAGACTTA GGCACAGCAC GATGCCCACC ACCACCAGTG TGCCGCACAA GGCCGTGGCG GTAGGGTATG
      GAGCCGTCGA GGAACGAGGA TTGTCACCTC CGGTCTGAAT CCGTGTCGTG CTACGGGTGG TGGTGGTCAC ACGGCGTGTT CCGGCACCGC CATCCCATAC

3601  TGTCTGAAAA TGAGCTCGGG GAGCGGGCTT GCACCGCTGA CGCATTTGGA AGACTTAAGG CAGCGGCAGA AGAAGATGCA GGCAGCTGAG TTGTTGTGTT
      ACAGACTTTT ACTCGAGCCC CTCGCCCGAA CGTGGCGACT GCGTAAACCT TCTGAATTCC GTCGCCGTCT TCTTCTACGT CCGTCGACTC AACAACACAA

3701  CTGATAAGAG TCAGAGGTAA CTCCCGTTGC GGTGCTGTTA ACGGTGGAGG GCAGTGTAGT CTGAGCAGTA CTCGTTGCTG CCGCGCGCGC CACCAGACAT
      GACTATTCTC AGTCTCCATT GAGGGCAACG CCACGACAAT TGCCACCTCC CGTCACATCA GACTCGTCAT GAGCAACGAC GGCGCGCGCG GTGGTCTGTA

                                                                                  HindIII
+1                                                                                                M  D  W  T  W  R
3801  AATAGCTGAC AGACTAACAG ACTGTTCCTT TCCATGGGTC TTTTCTGCAG TCACCGTCCT TGACACGAAG CTTGCCGCCA CCATGCATTG CACTTCGAGA
      TTATCGACTG TCTGATTGTC TGACAAGGAA AGGTACCCAG AAAAGACGTC AGTGGCAGGA ACTGTGCTTC GAACGGCGGT GGTACGTAAC GTGAAGCTCT
```

FIG. 54
(tiếp)

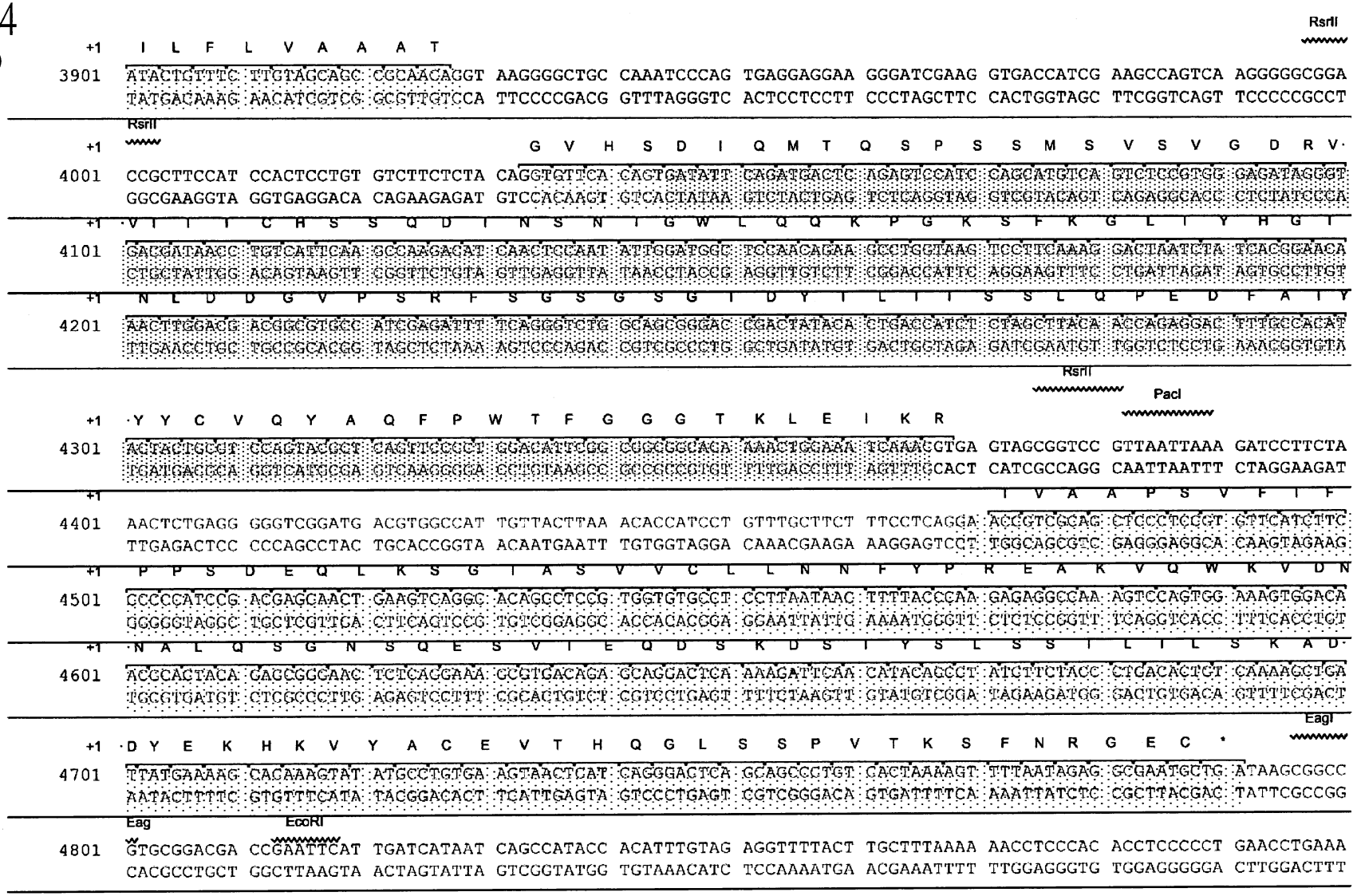


FIG. 54
(tiếp)

```
4901  CATAAAATGA ATGCAATTGT TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT
      GTATTTTACT TACGTTAACA ACAACAATTG AACAAATAAC GTCGAATATT ACCAATGTTT ATTTCGTTAT CGTAGTGTTT AAAGTGTTTA TTTCGTAAAA

                                                                                    BamHI
5001  TTTCACTGCA TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCCTCTACGC CGGACGCATC GTGGCCGGCA TCACCGGCGC
      AAAGTGACGT AAGATCAACA CCAAACAGGT TTGAGTAGTT ACATAGAATA GTACAGACCT AGGAGATGCG GCCTGCGTAG CACCGGCCGT AGTGGCCGCG

5101  CACAGGTGCG GTTGCTGGCG CCTATATCGC CGACATCACC GATGGGGAAG ATCGGGCTCG CCACTTCGGG CTCATGAGCG CTTGTTTCGG CGTGGGTATG
      GTGTCCACGC CAACGACCGC GGATATAGCG GCTGTAGTGG CTACCCCTTC TAGCCCGAGC GGTGAAGCCC GAGTACTCGC GAACAAAGCC GCACCCATAC

5201  GTGGCAGGCC CCGTGGCCGG GGGACTGTTG GGCGCCATCT CCTTGCATGC ACCATTCCTT GCGGCGGCGG TGCTCAACGG CCTCAACCTA CTACTGGGCT
      CACCGTCCGG GGCACCGGCC CCCTGACAAC CCGCGGTAGA GGAACGTACG TGGTAAGGAA CGCCGCCGCC ACGAGTTGCC GGAGTTGGAT GATGACCCGA

                                                 SalI
5301  GCTTCCTAAT GCAGGAGTCG CATAAGGGAG AGCGTCGACC TCGGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA
      CGAAGGATTA CGTCCTCAGC GTATTCCCTC TCGCAGCTGG AGCCCGGCGC AACGACCGCA AAAAGGTATC CGAGGCGGGG GGACTGCTCG TAGTGTTTTT

5401  TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG
      AGCTGCGAGT TCAGTCTCCA CCGCTTTGGG CTGTCCTGAT ATTTCTATGG TCCGCAAAGG GGGACCTTCG AGGGAGCACG CGAGAGGACA AGGCTGGGAC

5501  CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCGCT
      GGCGAATGGC CTATGGACAG GCGGAAAGAG GGAAGCCCTT CGCACCGCGA AAGAGTATCG AGTGCGACAT CCATAGAGTC AAGCCACATC CAGCAAGCGA

5601  CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC
      GGTTCGACCC GACACACGTG CTTGGGGGGC AAGTCGGGCT GGCGACGCGG AATAGGCCAT TGATAGCAGA ACTCAGGTTG GGCCATTCTG TGCTGAATAG

5701  GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA
      CGGTGACCGT CGTCGGTGAC CATTGTCCTA ATCGTCTCGC TCCATACATC CGCCACGATG TCTCAAGAAC TTCACCACCG GATTGATGCC GATGTGATCT

5801  AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG
      TCTTGTCATA AACCATAGAC GCGAGACGAC TTCGGTCAAT GGAAGCCTTT TTCTCAACCA TCGAGAACTA GGCCGTTTGT TTGGTGGCGA CCATCGCCAC

5901  GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA
      CAAAAAAACA AACGTTCGTC GTCTAATGCG CGTCTTTTTT TCCTAGAGTT CTTCTAGGAA ACTAGAAAAG ATGCCCCAGA CTGCGAGTCA CCTTGCTTTT

6001  CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT
      GAGTGCAATT CCCTAAAACC AGTACTCTAA TAGTTTTTCC TAGAAGTGGA TCTAGGAAAA TTTAATTTTT ACTTCAAAAT TTAGTTAGAT TTCATATATA

6101  GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCG
      CTCATTTGAA CCAGACTGTC AATGGTTACG AATTAGTCAC TCCGTGGATA GAGTCGCTAG ACAGATAAAG CAAGTAGGTA TCAACGGACT GAGGGGCAGC

6201  TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA
      ACATCTATTG ATGCTATGCC CTCCCGAATG GTAGACCGGG GTCACGACGT TACTATGGCG CTCTGGGTGC GAGTGGCCGA GGTCTAAATA GTCGTTATTT

6301  CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG
      GGTCGGTCGG CCTTCCCGGC TCGCGTCTTC ACCAGGACGT TGAAATAGGC GGAGGTAGGT CAGATAATTA ACAACGGCCC TTCGATCTCA TTCATCAAGC

6401  CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT
      GGTCAATTAT CAAACGCGTT GCAACAACGG TAACGATGTC CGTAGCACCA CAGTGCGAGC AGCAAACCAT ACCGAAGTAA GTCGAGGCCA AGGGTTGCTA
```

FIG. 54
(tiếp)

```
6501  CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT
      GTTCCGCTCA ATGTACTAGG GGGTACAACA CGTTTTTTCG CCAATCGAGG AAGCCAGGAG GCTAGCAACA GTCTTCATTC AACCGGCGTC ACAATAGTGA

6601  CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG
      GTACCAATAC CGTCGTGACG TATTAAGAGA ATGACAGTAC GGTAGGCATT CTACGAAAAG ACACTGACCA CTCATGAGTT GGTTCAGTAA GACTCTTATC

6701  TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT
      ACATACGCCG CTGGCTCAAC GAGAACGGGC CGCAGTTATG CCCTATTATG GCGCGGTGTA TCGTCTTGAA ATTTTCACGA GTAGTAACCT TTTGCAAGAA

6801  CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG
      GCCCCGCTTT TGAGAGTTCC TAGAATGGCG ACAACTCTAG GTCAAGCTAC ATTGGGTGAG CACGTGGGTT GACTAGAAGT CGTAGAAAAT GAAAGTGGTC

6901  CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT
      GCAAAGACCC ACTCGTTTTT GTCCTTCCGT TTTACGGCGT TTTTTCCCTT ATTCCCGCTG TGCCTTTACA ACTTATGAGT ATGAGAAGGA AAAAGTTATA

7001  TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA
      ATAACTTCGT AAATAGTCCC AATAACAGAG TACTCGCCTA TGTATAAACT TACATAAATC TTTTTATTTG TTTATCCCCA AGGCGCGTGT AAAGGGGCTT

7101  AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTGATGG CTCTTTGCGG CACCCATCGT
      TTCACGGTGG ACTGCAGATT CTTTGGTAAT AATAGTACTG TAATTGGATA TTTTTATCCG CATAGTGCTC CGGGACTACC GAGAAACGCC GTGGGTAGCA

7201  TCGTAATGTT CCGTGGCACC GAGGACAACC CTCAAGAGAA AATGTAATCA CACTGGCTCA CCTTCGGGTG GGCCTTTCTG CGTTTATAAG GAGACACTTT
      AGCATTACAA GGCACCGTGG CTCCTGTTGG GAGTTCTCTT TTACATTAGT GTGACCGAGT GGAAGCCCAC CCGGAAAGAC GCAAATATTC CTCTGTGAAA

7301  ATGTTTAAGA AGGTTGGTAA ATTCCTTGCG GCTTTGGCAG CCAAGCTAGA TCCGGCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC
      TACAAATTCT TCCAACCATT TAAGGAACGC CGAAACCGTC GGTTCGATCT AGGCCGACAC CTTACACACA GTCAATCCCA CACCTTTCAG GGGTCCGAGG

7401  CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC
      GGTCGTCCGT CTTCATACGT TTCGTACGTA GAGTTAATCA GTCGTTGGTC CACACCTTTC AGGGGTCCGA GGGGTCGTCC GTCTTCATAC GTTTCGTACG

7501  ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT
      TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG TATCAGGGCG GGGATTGAGG CGGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GGCGGGGTAC CGACTGATTA

7601  TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAAGCTA
      AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC GTTTTTCGAT

7701  GCTTGGGGCC ACCGCTCAGA GCACCTTCCA CCATGGCCAC CTCAGCAAGT TCCCACTTGA ACAAAAACAT CAAGCAAATG TACTTGTGCC TGCCCCAGGG
      CGAACCCCGG TGGCGAGTCT CGTGGAAGGT GGTACCGGTG GAGTCGTTCA AGGGTGAACT TGTTTTTGTA GTTCGTTTAC ATGAACACGG ACGGGGTCCC

7801  TGAGAAAGTC CAAGCCATGT ATATCTGGGT TGATGGTACT GGAGAAGGAC TGCGCTGCAA AACCCGCACC CTGGACTGTG AGCCCAAGTG TGTAGAAGAG
      ACTCTTTCAG GTTCGGTACA TATAGACCCA ACTACCATGA CCTCTTCCTG ACGCGACGTT TTGGGCGTGG GACCTGACAC TCGGGTTCAC ACATCTTCTC

7901  TTACCTGAGT GGAATTTTGA TGGCTCTAGT ACCTTTCAGT CTGAGGGCTC CAACAGTGAC ATGTATCTCA GCCCTGTTGC CATGTTTCGG GACCCCTTCC
      AATGGACTCA CCTTAAAACT ACCGAGATCA TGGAAAGTCA GACTCCCGAG GTTGTCACTG TACATAGAGT CGGGACAACG GTACAAAGCC CTGGGGAAGG

8001  GCAGAGATCC CAACAAGCTG GTGTTCTGTG AAGTTTTCAA GTACAACCGG AAGCCTGCAG AGACCAATTT AAGGCACTCG TGTAAACGGA TAATGGACAT
      CGTCTCTAGG GTTGTTCGAC CACAAGACAC TTCAAAAGTT CATGTTGGCC TTCGGACGTC TCTGGTTAAA TTCCGTGAGC ACATTTGCCT ATTACCTGTA

8101  GGTGAGCAAC CAGCACCCCT GGTTTGGAAT GGAACAGGAG TATACTCTGA TGGGAACAGA TGGGCACCCT TTTGGTTGGC CTTCCAATGG CTTTCCTGGG
      CCACTCGTTG GTCGTGGGGA CCAAACCTTA CCTTGTCCTC ATATGAGACT ACCCTTGTCT ACCCGTGGGA AAACCAACCG GAAGGTTACC GAAAGGACCC
```

FIG. 54
(tiếp)

```
8201  CCCCAAGGTC CGTATTACTG TGGTGTGGGC GCAGACAAAG CCTATGGCAG GGATATCGTG GAGGCTCACT ACCGCGCCTG CTTGTATGCT GGGGTCAAGA
      GGGGTTCCAG GCATAATGAC ACCACACCCG CGTCTGTTTC GGATACCGTC CCTATAGCAC CTCCGAGTGA TGGCGCGGAC GAACATACGA CCCCAGTTCT

8301  TTACAGGAAC AAATGCTGAG GTCATGCCTG CCCAGTGGGA ACTCCAAATA GGACCCTGTG AAGGAATCCG CATGGGAGAT CATCTCTGGG TGGCCCGTTT
      AATGTCCTTG TTTACGACTC CAGTACGGAC GGGTCACCCT TGAGGTTTAT CCTGGGACAC TTCCTTAGGC GTACCCTCTA GTAGAGACCC ACCGGGCAAA

8401  CATCTTGCAT CGAGTATGTG AAGACTTTGG GGTAATAGCA ACCTTTGACC CCAAGCCCAT TCCTGGGAAC TGGAATGGTG CAGGCTGCCA TACCAACTTT
      GTAGAACGTA GCTCATACAC TTCTGAAACC CCATTATCGT TGGAAACTGG GGTTCGGGTA AGGACCCTTG ACCTTACCAC GTCCGACGGT ATGGTTGAAA

8501  AGCACCAAGG CCATGCGGGA GGAGAATGGT CTGAAGCACA TCGAGGAGGC CATCGAGAAA CTAAGCAAGC GGCACCGGTA CCACATTCGA GCCTACGATC
      TCGTGGTTCC GGTACGCCCT CCTCTTACCA GACTTCGTGT AGCTCCTCCG GTAGCTCTTT GATTCGTTCG CCGTGGCCAT GGTGTAAGCT CGGATGCTAG

8601  CCAAGGGGGG CCTGGACAAT GCCCGTGGTC TGACTGGGTT CCACGAAACG TCCAACATCA ACGACTTTTC TGCTGGTGTC GCCAATCGCA GTGCCAGCAT
      GGTTCCCCCC GGACCTGTTA CGGGCACCAG ACTGACCCAA GGTGCTTTGC AGGTTGTAGT TGCTGAAAAG ACGACCACAG CGGTTAGCGT CACGGTCGTA

8701  CCGCATTCCC CGGACTGTCG GCCAGGAGAA GAAAGGTTAC TTTGAAGACC GCGGCCCCTC TGCCAATTGT GACCCCTTTG CAGTGACAGA AGCCATCGTC
      GGCGTAAGGG GCCTGACAGC CGGTCCTCTT CTTTCCAATG AAACTTCTGG CGCCGGGGAG ACGGTTAACA CTGGGGAAAC GTCACTGTCT TCGGTAGCAG

8801  CGCACATGCC TTCTCAATGA GACTGGCGAC GAGCCCTTCC AATACAAAAA CTAATTAGAC TTTGAGTGAT CTTGAGCCTT TCCTAGTTCA TCCCACCCCG
      GCGTGTACGG AAGAGTTACT CTGACCGCTG CTCGGGAAGG TTATGTTTTT GATTAATCTG AAACTCACTA GAACTCGGAA AGGATCAAGT AGGGTGGGGC

                BglII
8901  CCCCAGAGAG ATCTTTGTGA AGGAACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAAACT ACCTACAGAG ATTTAAAGCT CTAAGGTAAA TATAAAATTT
      GGGGTCTCTC TAGAAACACT TCCTTGGAAT GAAGACACCA CACTGTATTA ACCTGTTTGA TGGATGTCTC TAAATTTCGA GATTCCATTT ATATTTTAAA

9001  TTAAGTGTAT AATGTGTTAA ACTACTGATT CTAATTGTTT GTGTATTTTA GATTCCAACC TATGGAACTG ATGAATGGGA GCAGTGGTGG AATGCCTTTA
      AATTCACATA TTACACAATT TGATGACTAA GATTAACAAA CACATAAAAT CTAAGGTTGG ATACCTTGAC TACTTACCCT CGTCACCACC TTACGGAAAT

9101  ATGAGGAAAA CCTGTTTTGC TCAGAAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG GCTACTGCTG ACTCTCAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGAGAAAGGT
      TACTCCTTTT GGACAAAACG AGTCTTCTTT ACGGTAGATC ACTACTACTC CGATGACGAC TGAGAGTTGT AAGATGAGGA GGTTTTTTCT TCTCTTTCCA

9201  AGAAGACCCC AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAG TAATAGAACT CTTGCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAAG
      TCTTCTGGGG TTCCTGAAAG GAAGTCTTAA CGATTCAAAA AACTCAGTAC GACACAAATC ATTATCTTGA GAACGAACGA AACGATAAAT GTGGTGTTTC

9301  GAAAAAGCTG CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAAAAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTTCTTA
      CTTTTTCGAC GTGACGATAT GTTCTTTTAA TACCTTTTTA TAAGACATTG GAAATATTCA TCCGTATTGT CAATATTAGT ATTGTATGAC AAAAAAGAAT

9401  CTCCACACAG GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACTATGC TCAAAAATTG TGTACCTTTA GCTTTTTAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT
      GAGGTGTGTC CGTATCTCAC AGACGATAAT TATTGATACG AGTTTTTAAC ACATGGAAAT CGAAAAATTA AACATTTCCC CAATTATTCC TTATAAACTA

9501  GTATAGTGCC TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG CTTTAAAAAA CCTCCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA
      CATATCACGG AACTGATCTC TAGTATTAGT CGGTATGGTG TAAACATCTC CAAAATGAAC GAAATTTTTT GGAGGGTGTG GAGGGGGACT TGGACTTTGT

9601  TAAAATGAAT GCAATTGTTG TTGTTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT
      ATTTTACTTA CGTTAACAAC AACAATTGAA CAAATAACGT CGAATATTAC CAATGTTTAT TTCGTTATCG TAGTGTTTAA AGTGTTTATT TCGTAAAAAA

9701  TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC TAGCTTCGTG TCAAGGACGG TGACTGCAGT GAATAATAAA
      AGTGACGTAA GATCAACACC AAACAGGTTT GAGTAGTTAC ATAGAATAGT ACAGACCTAG ATCGAAGCAC AGTTCCTGCC ACTGACGTCA CTTATTATTT
```

FIG. 54
(tiếp)

MluI

```
9801   ATGTGTGTTT GTCCGAAATA CGCGTTTTGA GATTTCTGTC GCCGACTAAA TTCATGTCGC GCGATAGTGG TGTTTATCGC CGATAGAGAT GGCGATATTG
       TACACACAAA CAGGCTTTAT GCGCAAAACT CTAAAGACAG CGGCTGATTT AAGTACAGCG CGCTATCACC ACAAATAGCG GCTATCTCTA CCGCTATAAC

9901   GAAAAATCGA TATTTGAAAA TATGGCATAT TGAAAATGTC GCCGATGTGA GTTTCTGTGT AACTGATATC GCCATTTTTC CAAAAGTGAT TTTTGGGCAT
       CTTTTTAGCT ATAAACTTTT ATACCGTATA ACTTTTACAG CGGCTACACT CAAAGACACA TTGACTATAG CGGTAAAAAG GTTTTCACTA AAAACCCGTA

10001  ACGCGATATC TGGCGATAGC GCTTATATCG TTTACGGGGG ATGGCGATAG ACGACTTTGG TGACTTGGGC GATTCTGTGT GTCGCAAATA TCGCAGTTTC
       TGCGCTATAG ACCGCTATCG CGAATATAGC AAATGCCCCC TACCGCTATC TGCTGAAACC ACTGAACCCG CTAAGACACA CAGCGTTTAT AGCGTCAAAG

10101  GATATAGGTG ACAGACGATA TGAGGCTATA TCGCCGATAG AGGCGACATC AAGCTGGCAC ATGGCCAATG CATATCGATC TATACATTGA ATCAATATTG
       CTATATCCAC TGTCTGCTAT ACTCCGATAT AGCGGCTATC TCCGCTGTAG TTCGACCGTG TACCGGTTAC GTATAGCTAG ATATGTAACT TAGTTATAAC

10201  GCCATTAGCC ATATTATTCA TTGGTTATAT AGCATAAATC AATATTGGCT ATTGGCCATT GCATACGTTG TATCCATATC ATAATATGTA CATTTATATT
       CGGTAATCGG TATAATAAGT AACCAATATA TCGTATTTAG TTATAACCGA TAACCGGTAA CGTATGCAAC ATAGGTATAG TATTATACAT GTAAATATAA

10301  GGCTCATGTC CAACATTACC GCCATGTTGA CATTGATTAT TGACTAGTTA TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCATTAGT TCATAGCCCA TATATGGAGT
       CCGAGTACAG GTTGTAATGG CGGTACAACT GTAACTAATA ACTGATCAAT AATTATCATT AGTTAATGCC CCAGTAATCA AGTATCGGGT ATATACCTCA

10401  TCCGCGTTAC ATAACTTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG ACCGCCCAAC GACCCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA TAGTAACGCC
       AGGCGCAATG TATTGAATGC CATTTACCGG GCGGACCGAC TGGCGGGTTG CTGGGGGCGG GTAACTGCAG TTATTACTGC ATACAAGGGT ATCATTGCGG

10501  AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC GCCCCCTATT
       TTATCCCTGA AAGGTAACTG CAGTTACCCA CCTCATAAAT GCCATTTGAC GGGTGAACCG TCATGTAGTT CACATAGTAT ACGGTTCATG CGGGGGATAA

10601  GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCGCTA
       CTGCAGTTAC TGCCATTTAC CGGGCGGACC GTAATACGGG TCATGTACTG GAATACCCTG AAAGGATGAA CCGTCATGTA GATGCATAAT CAGTAGCGAT

10701  TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG
       AATGGTACCA CTACGCCAAA ACCGTCATGT AGTTACCCGC ACCTATCGCC AAACTGAGTG CCCCTAAAGG TTCAGAGGTG GGGTAACTGC AGTTACCCTC

10801  TTTGTTTTGG CACCAAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT CGTAACAACT CCGCCCCATT GACGCAAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG GGAGGTCTAT
       AAACAAAACC GTGGTTTTAG TTGCCCTGAA AGGTTTTACA GCATTGTTGA GGCGGGGTAA CTGCGTTTAC CCGCCATCCG CACATGCCAC CCTCCAGATA

                                                                                                                EagI
10901  ATAAGCAGAG CTCGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA GACGCCATCC ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGCG
       TATTCGTCTC GAGCAAATCA CTTGGCAGTC TAGCGGACCT CTGCGGTAGG TGCGACAAAA CTGGAGGTAT CTTCTGTGGC CCTGGCTAGG TCGGAGGCGC

       EagI
11001  GCCGGGAACG GTGCATTGGA ACGCGGATTC CCCGTGCCAA GAGTGACGTA AGTACCGCCT ATAGAGTCTA TAGGCCCACC CCCTTGGCTT CTTATGCATG
       CGGCCCTTGC CACGTAACCT TGCGCCTAAG GGGCACGGTT CTCACTGCAT TCATGGCGGA TATCTCAGAT ATCCGGGTGG GGGAACCGAA GAATACGTAC

11101  CTATACTGTT TTTGGCTTGG GGTCTATACA CCCCCGCTTC CTCATGTTAT AGGTGATGGT ATAGCTTAGC CTATAGGTGT GGGTTATTGA CCATTATTGA
       GATATGACAA AAACCGAACC CCAGATATGT GGGGGCGAAG GAGTACAATA TCCACTACCA TATCGAATCG GATATCCACA CCCAATAACT GGTAATAACT

11201  CCACTCCCCT ATTGGTGACG ATACTTTCCA TTACTAATCC ATAACATGGC TCTTTGCCAC AACTCTCTTT ATTGGCTATA TGCCAATACA CTGTCCTTCA
       GGTGAGGGGA TAACCACTGC TATGAAAGGT AATGATTAGG TATTGTACCG AGAAACGGTG TTGAGAGAAA TAACCGATAT ACGGTTATGT GACAGGAAGT

11301  GAGACTGACA CGGACTCTGT ATTTTTACAG GATGGGGTCT CATTTATTAT TTACAAATTC ACATATACAA CACCACCGTC CCCAGTGCCC GCAGTTTTTA
       CTCTGACTGT GCCTGAGACA TAAAAATGTC CTACCCCAGA GTAAATAATA AATGTTTAAG TGTATATGTT GTGGTGGCAG GGGTCACGGG CGTCAAAAAT
```

```
11401  TTAAACATAA CGTGGGATCT CCACGCGAAT CTCGGGTACG TGTTCCGGAC ATGGGCTCTT CTCCGGTAGC GGCGGAGCTT CTACATCCGA GCCCTGCTCC
       AATTTGTATT GCACCCTAGA GGTGCGCTTA GAGCCCATGC ACAAGGCCTG TACCCGAGAA GAGGCCATCG CCGCCTCGAA GATGTAGGCT CGGGACGAGG

11501  CATGCCTCCA GCGACTCATG GTCGCTCGGC AGCTCCTTGC TCCTAACAGT GGAGGCCAGA CTTAGGCACA GCACGATGCC CACCACCACC AGTGTGCCGC
       GTACGGAGGT CGCTGAGTAC CAGCGAGCCG TCGAGGAACG AGGATTGTCA CCTCCGGTCT GAATCCGTGT CGTGCTACGG GTGGTGGTGG TCACACGGCG

11601  ACAAGGCCGT GGCGGTAGGG TATGTGTCTG AAAATGAGCT CGGGGAGCGG GCTTGCACCG CTGACGCATT TGGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAAGA
       TGTTCCGGCA CCGCCATCCC ATACACAGAC TTTTACTCGA GCCCCTCGCC CGAACGTGGC GACTGCGTAA ACCTTCTGAA TTCCGTCGCC GTCTTCTTCT

11701  TGCAGGCAGC TGAGTTGTTG TGTTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACTCCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT
       ACGTCCGTCG ACTCAACAAC ACAAGACTAT TCTCAGTCTC CATTGAGGGC AACGCCACGA CAATTGCCAC CTCCCGTCAC ATCAGACTCG TCATGAGCAA

11801  GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCTTGACAC G
       CGACGGCGCG CGCGGTGGTC TGTATTATCG ACTGTCTGAT TGTCTGACAA GGAAAGGTAC CCAGAAAAGA CGTCAGTGGC AGGAACTGTG C
```

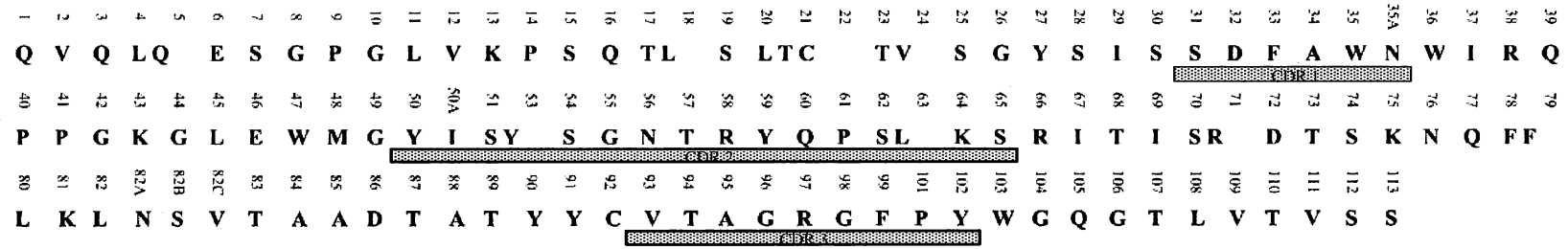
FIG. 54 (tiếp)

Chuỗi năng

FIG. 55A

Trình tự tín hiệu **MDWTWRILFLVAAATGVHS**

V_H



C_H

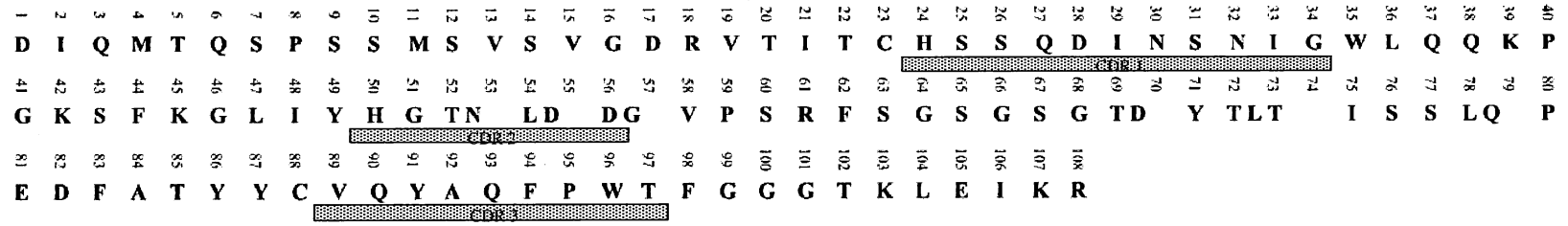
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDECTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nhe

FIG. 55B

Trình tự tín hiệu **MDWTWRILFLVAAATGVHS**

V_L



C_L

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Bản đồ của các gốc lộ diện trên bề mặt dùng để ngụy trang cho chuỗi nặng của kháng thể 806

FIG. 56A

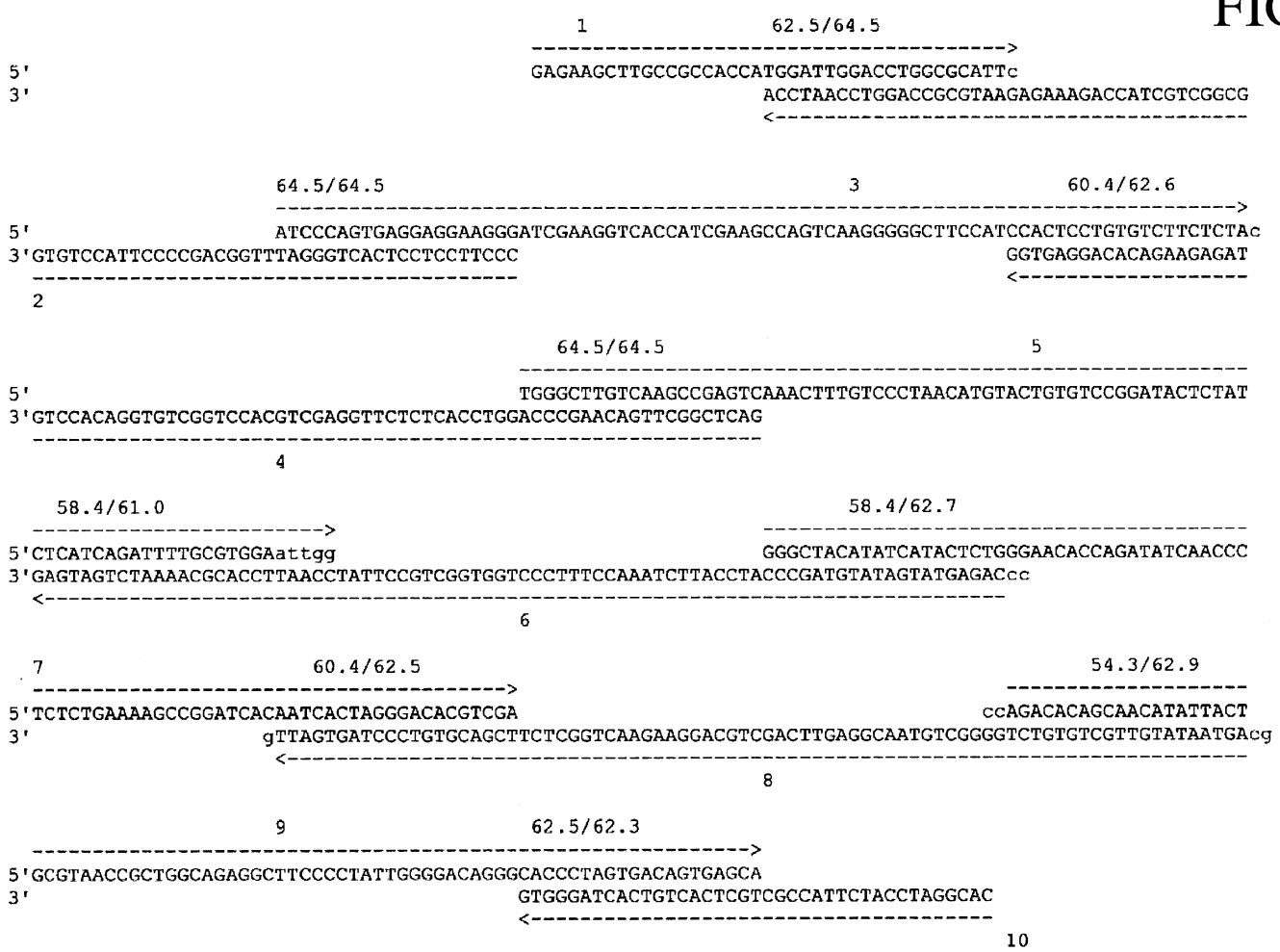
```
mAb 806     Chuỗi nặng    Nhóm phụ VH-I ở chuột nhắt (Tương đồng với nhóm phụ II ở người)
            *   * ** *   * **       * **                    ***                  *      **
            * * * ** ** * *** * * * ** * *                 ***** *                * *    **
            * * * ** ** ***** * * * ** * *                 ***** *          !     * * * * ***     *
mAb 806     DVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLN
VH36germ    E                       S   D     Y-     K       Y        S Y                    YY
AAA37941            D       S                 GYS H       H        H  S N
CAD26810    E                       S   D    NGF- I   K       Y        S Y                Q   Y

Liên ứng    Q         A               S F  S          P  KA   L                   LT  K       V T
                      G                 L                RG   I                   V   V       S K
                      T                 G                     M                       R    S  F Q
                                        Y
                                        D

các gốc
thay đổi    Q         G               S    S          P  KG                       T       S
            QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITITRDTSKSQFFLQLN

             *  **                     **
             * ***                     **       **
            ** ***  *                  **  * * **
            SVTIEDTATYYC---VTAGRGFPY---WGQGTLVTVSA
VH36           S       ------------------------
AAA37941       T       ARIYYYGSSYVWFAY
CAD26810       T   G   ACRSYGRTPYYFDF      T    S

Liên ứng       PV      AR                        JH1,4,5
               AA
               SE
các gốc        AP                                S
thay đổi    SVTAPDTATYYC---VTAGRGFPY---WGQGTLVTVSS
```

FIG. 56B

Chú thích: **các CDR** màu đỏ; ***các gốc lộ diện trên bề mặt (ngoài ra * chỉ mức độ lộ diện trên bề mặt lớn hơn);**
N, vị trí có khả năng glycosyl hóa

Bản đồ chồng lấp oligonucleotit ban đầu cho một thiết kế của chuỗi nặng của kháng thể 806 được ngụy trang

FIG. 56C



Chú thích: trường hợp dưới cùng = bổ sung vào oligo; trường hợp trên cùng = loại bỏ khỏi oligo...việc này được thực hiện để làm tăng Tm của các oligo chồng lấp được sử dụng để tổng hợp vùng V

Bản đồ của các gốc lộ diện trên bề mặt dùng để ngụy trang cho chuỗi nhẹ của kháng thể 806

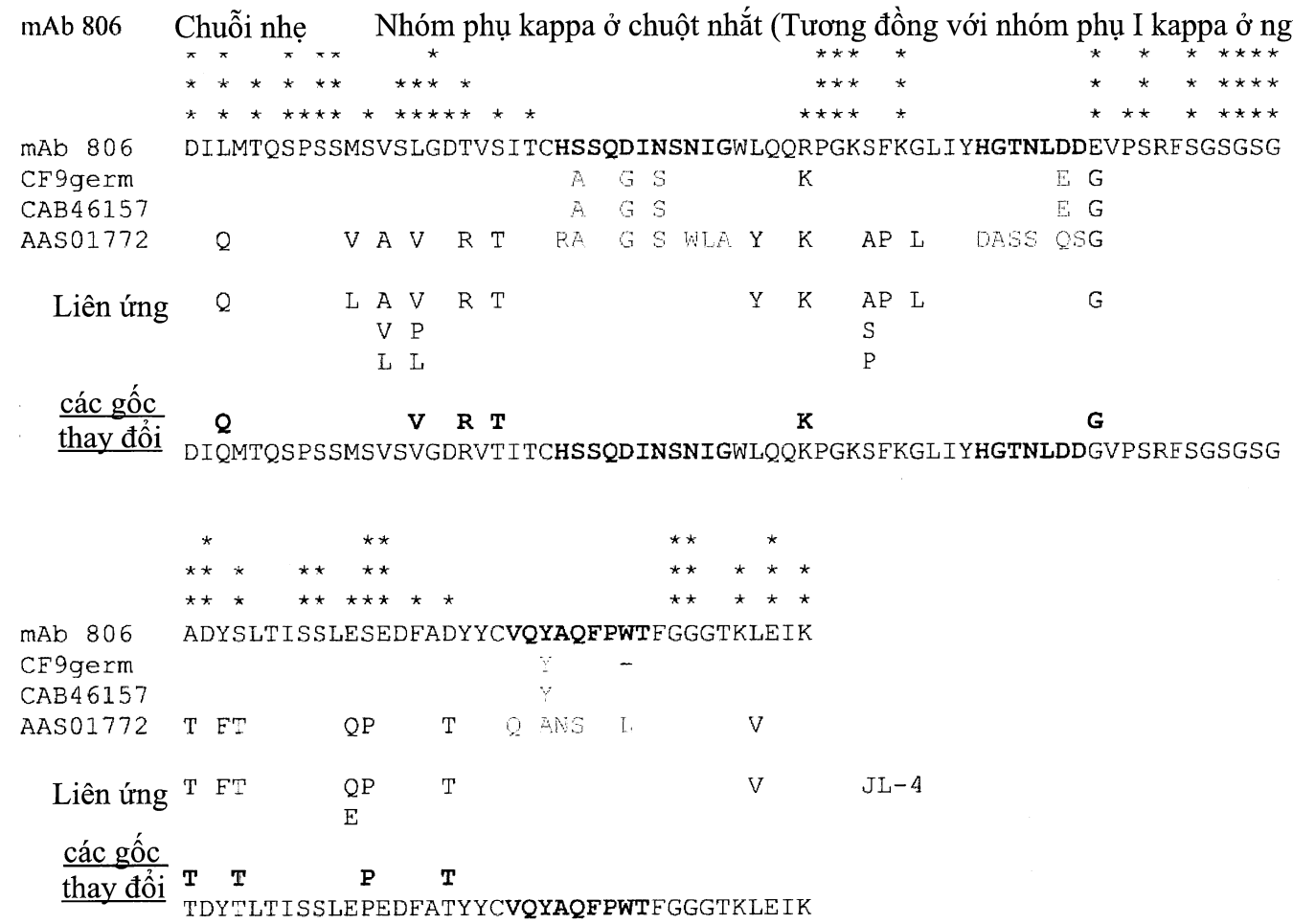


FIG. 57A

FIG. 57B

Chú thích: các CDR màu đỏ;

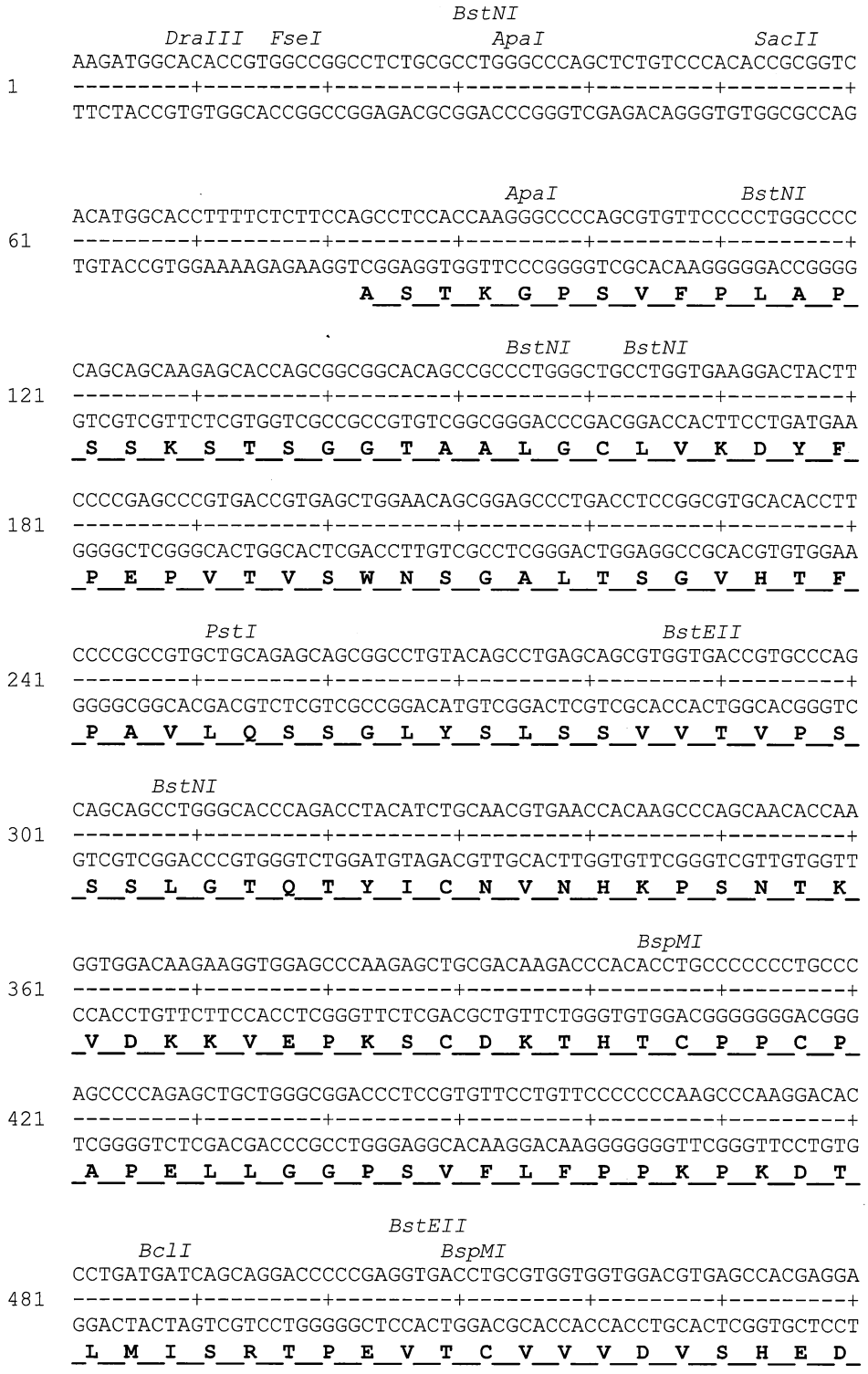
***các gốc lộ diện trên bề mặt (ngoài ra * chỉ mức độ lộ diện trên bề mặt lớn hơn)**

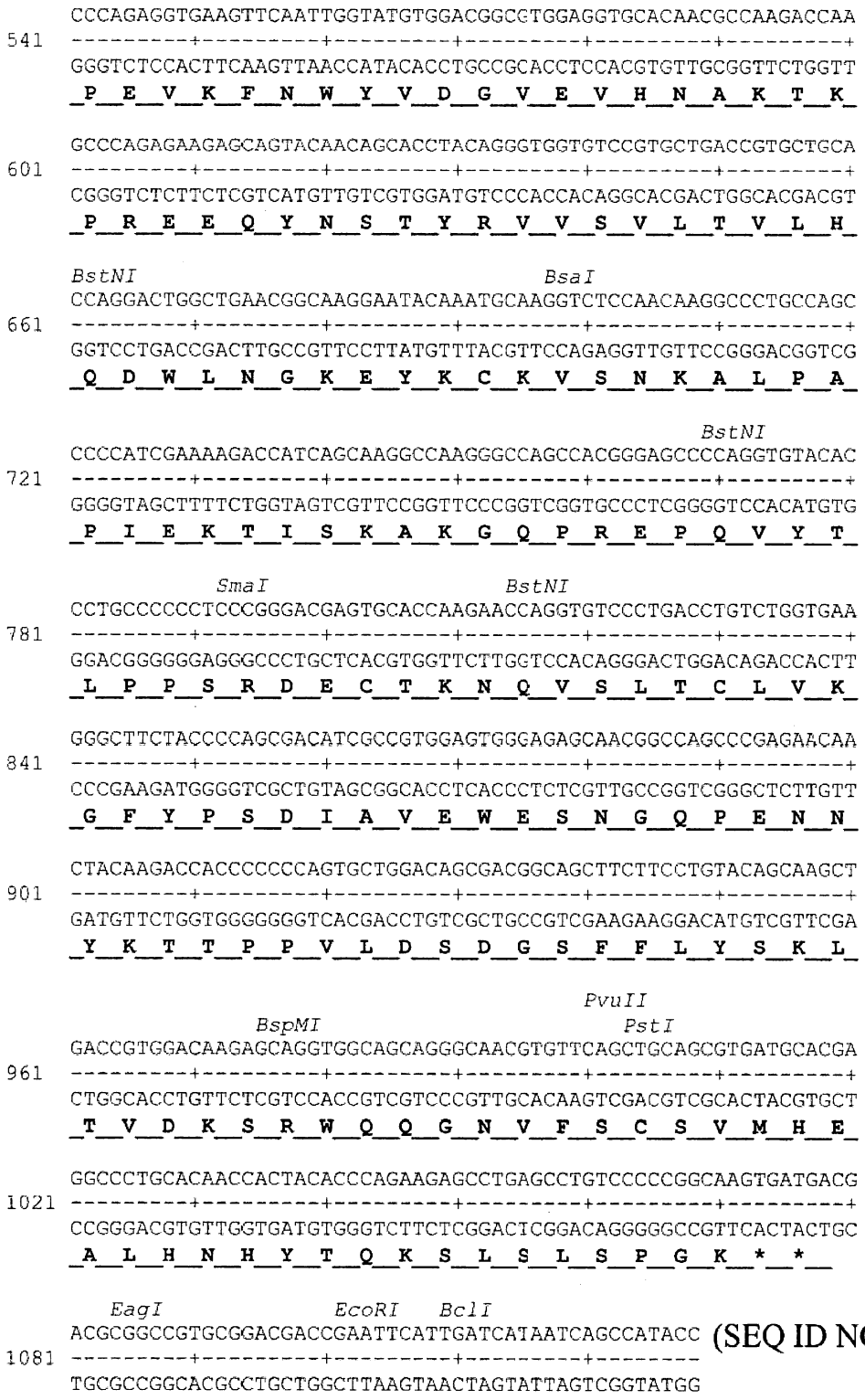
Bản đồ chồng lấp oligonucleotit ban đầu cho một thiết kế của chuỗi nhẹ của kháng thể 806 được ngụy trang

FIG. 57C

Chú thích: trường hợp dưới cùng = bổ sung vào oligo; trường hợp trên cùng = loại bỏ khỏi oligo...việc này được thực hiện để làm tăng Tm của các oligo chồng lấp được sử dụng để tổng hợp vùng V

FIG.58


BstNI
DraIII FseI ApaI SacII
AAGATGGCACACCGTGGCCGGCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTC
1
TTCTACCGTGTGGCACCGGCCGGAGACGCGGACCCGGGTCGAGACAGGGTGTGGCGCCAG
ApaI BstNI
ACATGGCACCTTTTCTCTTCCAGCCTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCC
61
TGTACCGTGGAAAAGAGAAGGTCGGAGGTGGTTCCCCGGGGTCGCACAAGGGGGACCGGGG
A S T K G P S V F P L A P
BstNI BstNI
CAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTT
121
GTCGTCGTTCTCGTGGTCGCCGCCGTGTCGGCGGGACCCGACGGACCACTTCCTGATGAA
S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F
CCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTT
181
GGGGCTCGGGCACTGGCACTCGACCTTGTCGCCTCGGGACTGGAGGCCGCACGTGTGGAA
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F
PstI BstEII
CCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAG
241
GGGGCGGCACGACGTCTCGTCGCCGGACATGTCGGACTCGTCGCACCACTGGCACGGGTC
P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S
BstNI
CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAA
301
GTCGTCGGACCCGTGGGTCTGGATGTAGACGTTGCACTTGGTGTTCGGGTCGTTGTGGTT
S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
BspMI
GGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCC
361
CCACCTGTTCTTCCACCTCGGGTTCTCGACGCTGTTCTGGGTGTGGACGGGGGGGACGGG
V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P
AGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACAC
421
TCGGGGTCTCGACGACCCGCCTGGGAGGCACAAGGACAAGGGGGGGTTCGGGTTCCTGTG
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
BstEII
BclI BspMI
CCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGA
481
GGACTACTAGTCGTCCTGGGGGCTCCACTGGACGCACCACCACCTGCACTCGGTGCTCCT
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D



(SEQ ID NO:80)

FIG.58 (tiếp)

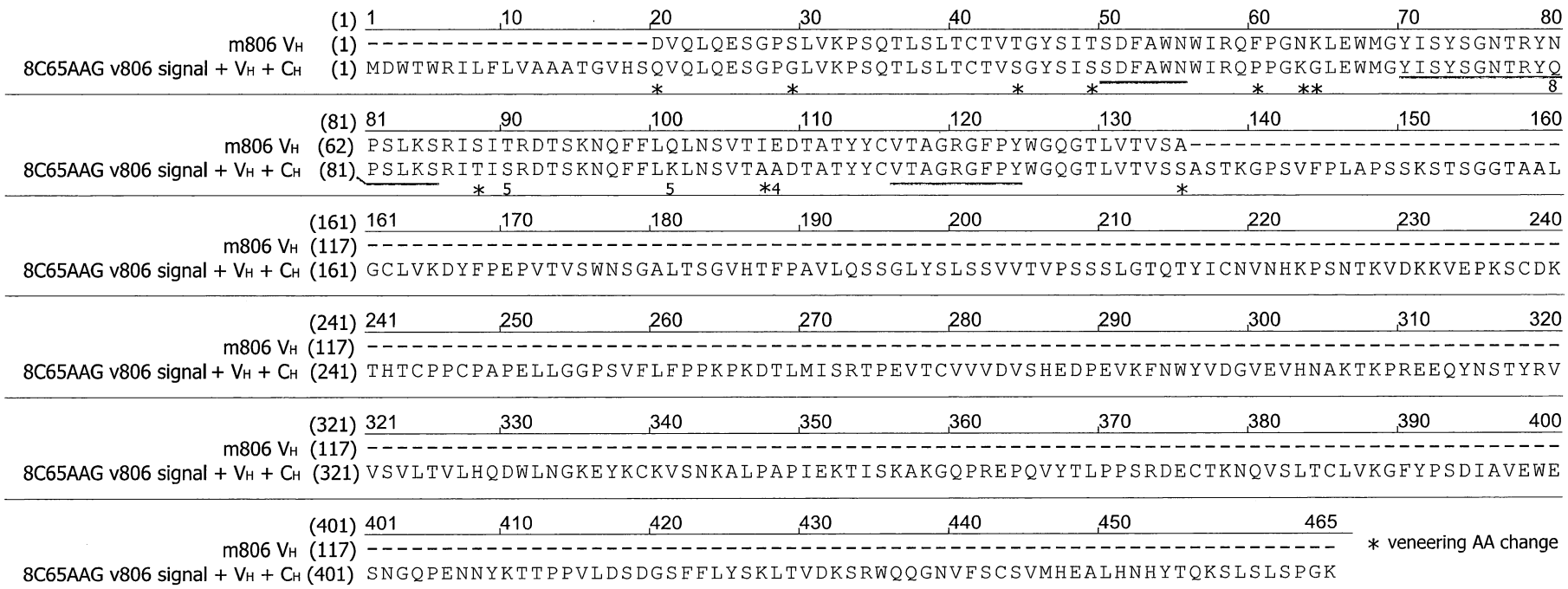

(1) 1 10 20 30 40 50 60 70 80
m806 VH (1) ----------DVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
8C65AAG v806 signal + VH + CH (1) MDWTWRILFLVAAATGVHSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQ
(81) 81 90 100 110 120 130 140 150 160
m806 VH (62) PSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSA----------
8C65AAG v806 signal + VH + CH (81) PSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
(161) 161 170 180 190 200 210 220 230 240
m806 VH (117) ----------
8C65AAG v806 signal + VH + CH (161) GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
(241) 241 250 260 270 280 290 300 310 320
m806 VH (117) ----------
8C65AAG v806 signal + VH + CH (241) THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
(321) 321 330 340 350 360 370 380 390 400
m806 VH (117) ----------
8C65AAG v806 signal + VH + CH (321) VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDECTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
(401) 401 410 420 430 440 450 465
m806 VH (117) ----------
8C65AAG v806 signal + VH + CH (401) SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
* veneering AA change

FIG.59

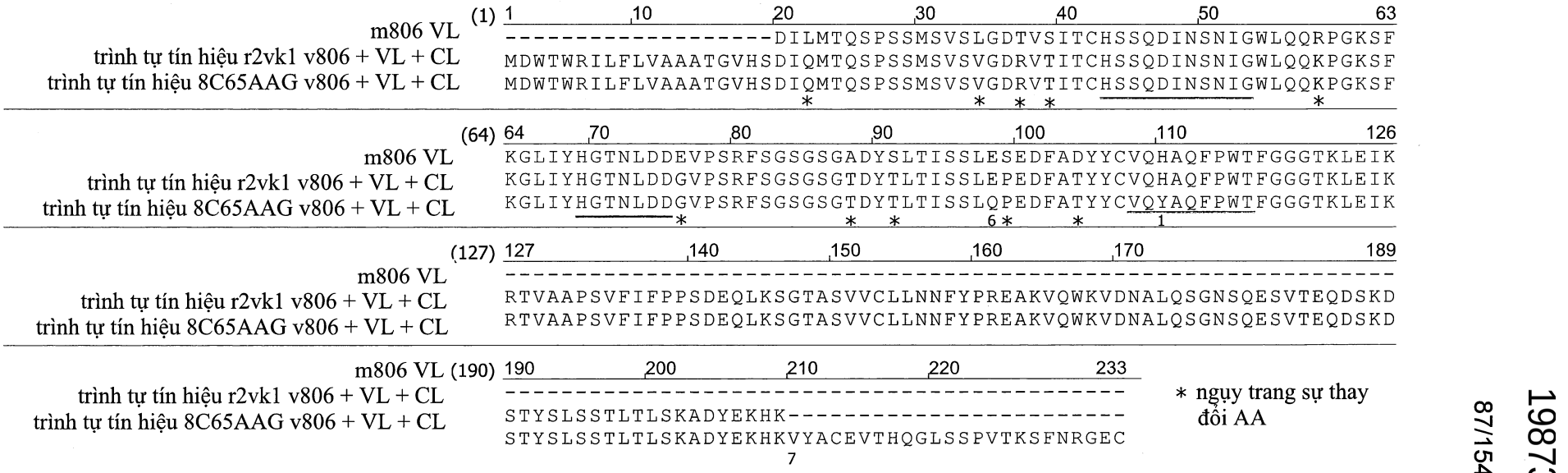

(1) 1 10 20 30 40 50 63
m806 VL ----------DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSF
trình tự tín hiệu r2vk1 v806 + VL + CL MDWTWRILFLVAAATGVHSDIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF
trình tự tín hiệu 8C65AAG v806 + VL + CL MDWTWRILFLVAAATGVHSDIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF
(64) 64 70 80 90 100 110 126
m806 VL KGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQHAQFPWTFGGGTKLEIK
trình tự tín hiệu r2vk1 v806 + VL + CL KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCVQHAQFPWTFGGGTKLEIK
trình tự tín hiệu 8C65AAG v806 + VL + CL KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIK
(127) 127 140 150 160 170 189
m806 VL ----------
trình tự tín hiệu r2vk1 v806 + VL + CL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
trình tự tín hiệu 8C65AAG v806 + VL + CL RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
m806 VL (190) 190 200 210 220 233
trình tự tín hiệu r2vk1 v806 + VL + CL ----------
trình tự tín hiệu 8C65AAG v806 + VL + CL STYSLSSTLTLSKADYEKHK----------
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
* ngụy trang sự thay đổi AA

FIG.60

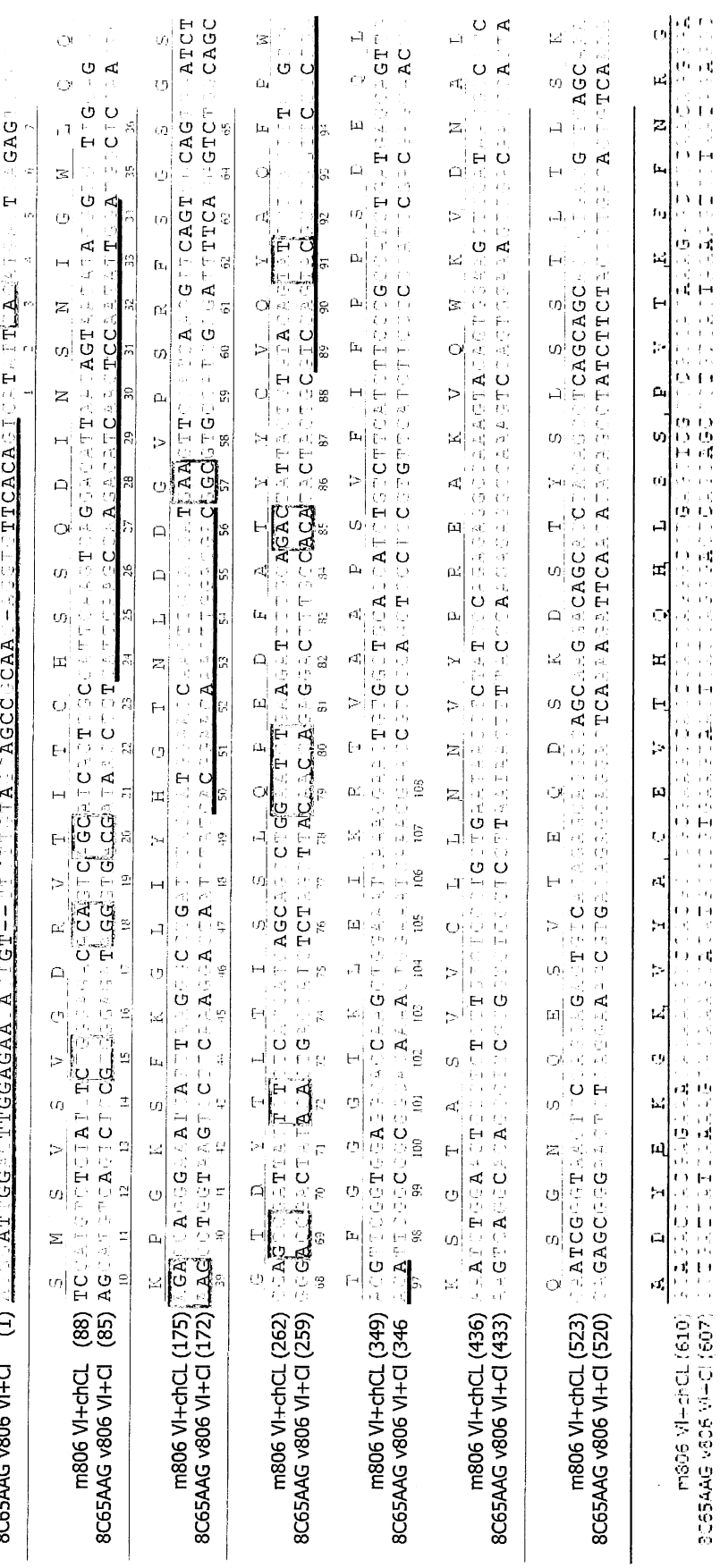

Chú thích
Ngụy trang sự thay đổi codon
trình tự ADN được bảo toàn
Trình tự ADN được thay đổi để tối ưu hóa codon
CDR
Trình tự tín hiệu

FIG.61

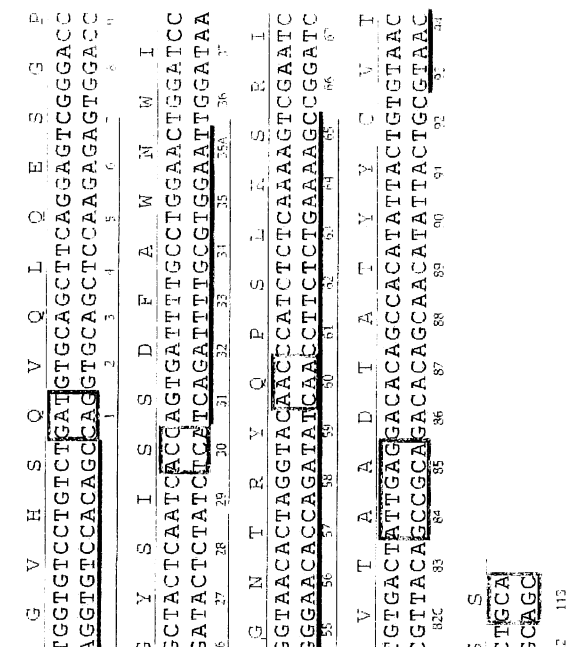

MAB mu806 Vh
8C65AAG v806 Vh
Chú thích
Ngụy trang sự thay đổi codon
trình tự ADN được bảo toàn
Trình tự ADN được thay đổi để tối ưu hóa codon
CDR
Trình tự tín hiệu

FIG.62

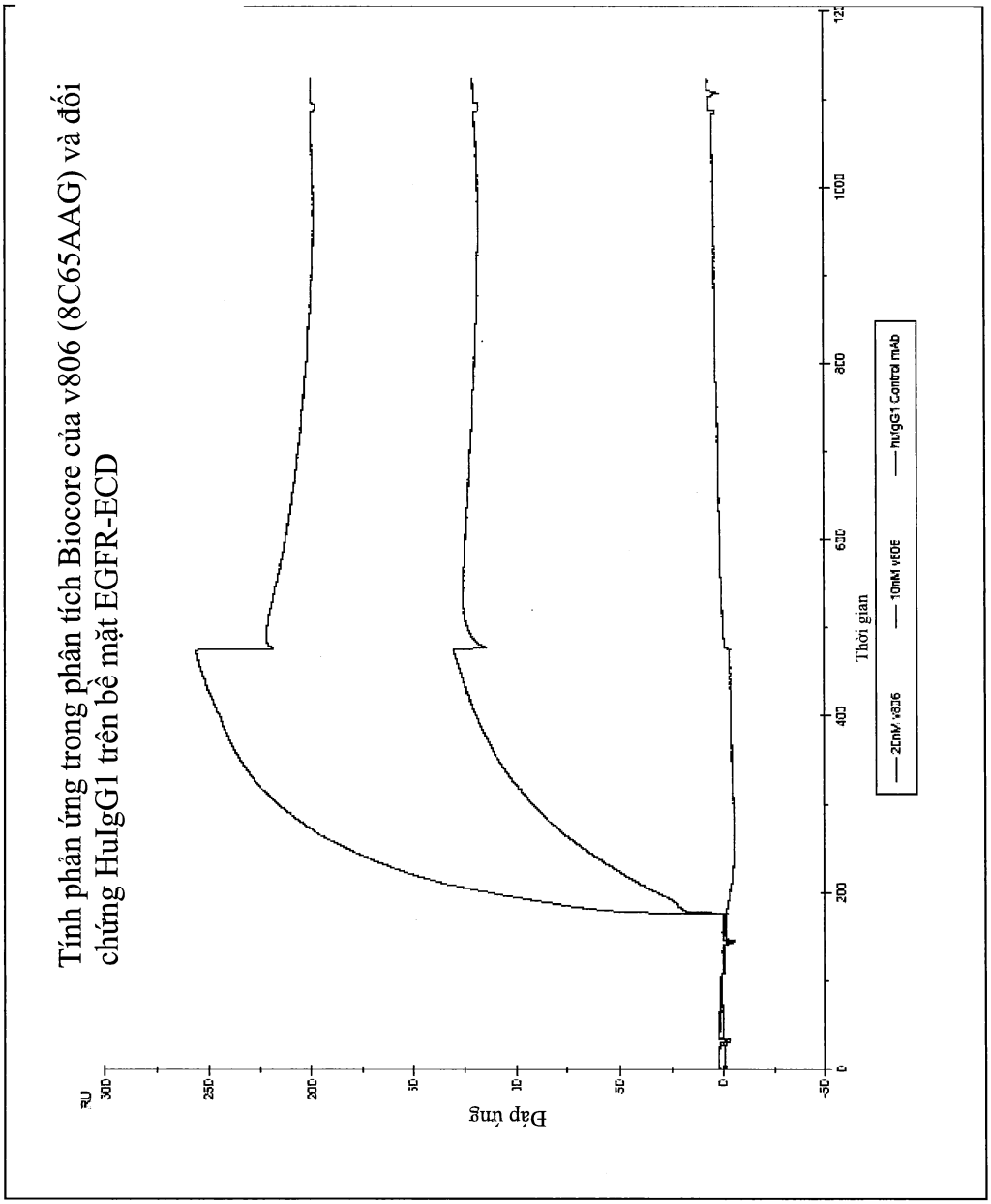


FIG.63

Hình này cho thấy liên kết của kháng thể hu806 tinh khiết thu được từ các tế bào 293 chuyển nhiễm tạm thời với EGFR-ECD như được xác định bằng phân tích Biacore. Không quan sát thấy EGFR-ECD liên kết với kháng thể đối chứng IgG1 tinh khiết ở người

FIG.64

```
LOCUS
8C65AAG                 11891 bp    DNA     circular     27-NOV-2006
      DEFINITION  veneered 806 HC variable region, GeneArt human HC constant
region, veneered LC variable region, cod-opt LC constant region, combined in
large Lonza Vector.
SOURCE
  ORGANISM
COMMENT     This file is created by Vector NTI
            http://www.invitrogen.com/
COMMENT     VNTDATE|418148572|
COMMENT     VNTDBDATE|428174363|
COMMENT     LSOWNER|
COMMENT     VNTNAME|8C65AAG|
COMMENT     VNTAUTHORNAME|Anne Murray|
COMMENT     VNTAUTHORTEL|646 888-2342|
COMMENT     VNTAUTHORFAX|646 422-0492|
COMMENT     VNTAUTHOREML|murraya1@mskcc.org|
COMMENT     VNTAUTHORAD1|Ludwig Inst. at Memorial Sloan Kettering Cancer Center|
COMMENT     VNTAUTHORAD2|1275 York Ave.|
COMMENT     VNTAUTHORAD3|New York, NY 10021 |
COMMENT     VNTAUTHORAD4|USA|
COMMENT     VNTREPLTYPE|Plasmid
COMMENT     Vector_NTI_Display_Data_(Do_Not_Edit!)
COMMENT     (SXF
COMMENT      (CGexDoc "8C65AAG" 0 11891
COMMENT       (CDBMol 0 0 1 6558 1 0 0 1 0 "" "" 0 0 0 0 (CObList) (CObList)
(CObList)
COMMENT        (CObList) -1 "")
COMMENT       (CDocSetData 1 1 0 0 0 0 "MAIN" 1 1 1 1 0 0 1 1 1 0 10 10 40 50 0
1 0
COMMENT        (CHomObj 0 0 0 3 75) (CWordArray) (CWordArray)
COMMENT        (CStringList "BamHI" "BglII" "DraIII" "FseI" "HindIII" "MluI"
"NotI"
COMMENT         "PacI" "RsrII" "SalI") (CStringList "atg" "gtg")
COMMENT        (CStringList "taa" "tga" "tag") (CObList) 1 "{(0,1),2}" 0 0 "" 0
COMMENT        4294967295 0 1 0 0 0 0 1 "MAIN" 0 0 30 0
COMMENT        (CProteinMotifSearchObject 100 10 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0))
COMMENT       (CMolPar 1 0 0 0 0 1 11891 0 0 0 0 0 0 0 0) (CStringList)
(CStringList)
COMMENT       (CObList) (COAPar 25 250 50 0 6 4 3 7) (COAPar 25 250 50 0 6 4 3
7)
COMMENT       (COAPar 25 250 50 0 6 4 3 7)
COMMENT       (CObList #0=(CRSite (CStringList) "BamHI" "ggatcc" 2 0 1 5059 0 0
"")
COMMENT        #1=(CRSite (CStringList) "BglII" "agatct" 2 0 1 8910 0 0 "")
COMMENT        #2=(CRSite (CStringList) "DraIII" "cacnnngtg" 7 0 2 128 0 543 0 0
"")
COMMENT        #3=(CRSite (CStringList) "FseI" "ggccggcc" 7 0 1 551 0 0 "")
COMMENT        #4=(CRSite (CStringList) "HindIII" "aagctt" 2 0 2 2 0 3869 0 0
"")
COMMENT        #5=(CRSite (CStringList) "MluI" "acgcgt" 2 0 1 9821 0 0 "")
COMMENT        #6=(CRSite (CStringList) "NotI" "gcggccgc" 3 0 1 1878 0 0 "")
COMMENT        #7=(CRSite (CStringList) "PacI" "ttaattaa" 6 0 1 4387 0 0 "")
COMMENT        #8=(CRSite (CStringList) "RsrII" "cggwccg" 3 0 2 3999 0 4377 0 0
"")
```

```
COMMENT         #9=(CRSite (CStringList) "SalI" "gtcgac" 2 0 1 5335 0 0 ""))
COMMENT        (CObList
COMMENT         #10=(CFSignal (CObList) "GeneArt HC C-Reg" 2 0 0 553 1643 0
COMMENT              (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #11=(CFSignal (CObList) "SV40 polyA" 25 0 0 1644 1875 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #12=(CFSignal (CObList) "Signal (SV40E (and SV40 ori))" 21 0 0
7356 7699
COMMENT              0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #13=(CFSignal (CObList) "RNA (beta-lactamase) Amp(R)" 53 0 1 6121
6981 0
COMMENT              (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #14=(CFSignal (CObList) "mRNA (GS cDNA)" 54 0 0 7707 8906 0
COMMENT              (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #15=(CFSignal (CObList) "Promoter (hCMV-MIE)" 30 0 0 9784 10926 0
COMMENT              (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #16=(CFSignal (CObList) "Intron (SV40 intron + poly A)" 15 0 0
8909 9760
COMMENT              0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #17=(CFSignal (CObList) "5'UTR_1" 52 0 0 10927 11047 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #18=(CFSignal (CObList) "Intron_1" 15 0 0 11048 11874 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #19=(CFSignal (CObList) "5'UTR_2" 52 0 0 11875 11891 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #20=(CFSignal (CObList) "Heavy Chain 806 V-Region Insert" 45 0 0
128 542
COMMENT              0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #21=(CFSignal (CObList) "HtoY" 23 0 0 4315 4315 0 (CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #22=(CFSignal (CObList) "Light-Const. chg 2.1-3" 23 0 0 4716 4716
0
COMMENT              (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #23=(CFSignal (CObList) "Light-Chain 806 V-Region insert" 45 0 0
3999
COMMENT              4376 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #24=(CFSignal (CObList) "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)" 30 0 0
1884
COMMENT              2902 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #25=(CFSignal (CObList) "5'UTR_2" 52 0 0 3851 3867 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #26=(CFSignal (CObList) "Intron_1" 15 0 0 3024 3850 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #27=(CFSignal (CObList) "5'UTR_1" 52 0 0 2903 3023 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #28=(CFSignal (CObList) "SV40 poly A" 25 0 0 4827 5063 0
(CStringList)
COMMENT              (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT         #29=(CFSignal (CObList) "Codon-Optimized Kappa Constant Region" 2
```

FIG.64 (tiếp)

```
0 0
COMMENT             4390 4800 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 ""))
(CObList)
COMMENT       (CObList) (CObList) (CObList) (CObList) (CObList)
COMMENT       (CTextView 0
COMMENT        #30=(CGroupPar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 0 0 180)
COMMENT             (CObjectList
COMMENT              #31=(CRefLinePar
COMMENT                   (CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 0 2 0 1 233) "8C65AAG"
2) 5 ""
COMMENT                   0 4)
COMMENT              #32=(CFolderPar
COMMENT                   (CGroupPar (CParagraph 1 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT                    (CObjectList
COMMENT                     #33=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "DNA Plasmid '8C65AAG'" 1)
COMMENT                     #34=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "veneered 806 HC variable region, GeneArt human
HC constant region, veneered LC variable region, cod-opt LC constant region,
combined in large Lonza Vector"
COMMENT                          1)
COMMENT                     #35=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "Currently local object. Original author: Anne"
1)
COMMENT                     #36=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "Created: 08/07/06 04:22PM" 1)
COMMENT                     #37=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "Last Modified: 11/27/06 05:19PM" 1)
COMMENT                     #38=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "length: 11891 bp" 1)
COMMENT                     #39=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "storage type: Basic" 1)
COMMENT                     #40=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT                          "form: Circular" 1))) "General Description")
COMMENT              #41=(CFolderPar
COMMENT                   (CGroupPar (CParagraph 2 (0 0) 1 1 0 0 178)
(CObjectList))
COMMENT                   "Standard Fields")
COMMENT              #42=(CFolderPar
COMMENT                   (CGroupPar (CParagraph 5 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT                    (CObjectList
COMMENT                     #43=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
"Anne" 1)))
COMMENT                   "Original Author")
COMMENT              #44=(CRefLinePar
COMMENT                   (CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 0 2 0 0 233) "Comments"
2) 1 ""
COMMENT                   0 0)
COMMENT              #45=(CFolderPar
COMMENT                   (CGroupPar (CParagraph 8 (0 0) 1 2 0 0 178)
(CObjectList))
COMMENT                   "Annotations")
COMMENT              #46=(CFolderPar
COMMENT                   (CGroupPar (CParagraph 12 (6 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT                    (CObjectList
COMMENT                     #47=(CFolderPar
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                          (CGroupPar (CParagraph 2 (7 2 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #48=(CFolderPar
COMMENT                                 (CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 553 (3 #10# 0) 1 2 2 0 194)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #49=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "Start: 553   End: 1643" 1)
COMMENT                                   #50=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "GeneArt human HC C-Reg" 1)))
COMMENT                                 "GeneArt HC C-Reg")
COMMENT                            #51=(CFolderPar
COMMENT                                 (CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 4390 (3 #29# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #52=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "Start: 4390  End: 4800" 1)))
COMMENT                                 "Codon-Optimized Kappa Constant
Region")))
COMMENT                               "C-Region (2 total)")
COMMENT                          #53=(CFolderPar
COMMENT                               (CGroupPar (CParagraph 15 (7 15 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #54=(CFolderPar
COMMENT                                      (CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 3024 (3 #26# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #55=(CLinePar
COMMENT                                             (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                             "Start: 3024  End: 3850" 1)
COMMENT                                        #56=(CLinePar
COMMENT                                             (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                             "intron" 1))) "Intron_1")
COMMENT                                 #57=(CFolderPar
COMMENT                                      (CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 8909 (3 #16# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #58=(CLinePar
COMMENT                                             (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                             "Start: 8909  End: 9760" 1)
COMMENT                                        #59=(CLinePar
COMMENT                                             (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                             "SV40 intron + poly A" 1)))
COMMENT                                      "Intron (SV40 intron + poly A)")
COMMENT                                 #60=(CFolderPar
COMMENT                                      (CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 11048 (3 #18# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #61=(CLinePar
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "Start: 11048  End: 11874" 1)
COMMENT                                  #62=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "intron" 1))) "Intron_1")))
COMMENT                             "Intron (3 total)")
COMMENT                        #63=(CFolderPar
COMMENT                             (CGroupPar (CParagraph 21 (7 21 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                              (CObjectList
COMMENT                               #64=(CFolderPar
COMMENT                                    (CGroupPar
COMMENT                                     (CParagraph 7356 (3 #12# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                      #65=(CLinePar
COMMENT                                           (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                           "Start: 7356  End: 7699" 1)
COMMENT                                      #66=(CLinePar
COMMENT                                           (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                           "SV40E (and SV40 ori)" 1)))
COMMENT                                   "Signal (SV40E (and SV40 ori))")))
COMMENT                             "Misc. Feature (1 total)")
COMMENT                        #67=(CFolderPar
COMMENT                             (CGroupPar (CParagraph 23 (7 23 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                              (CObjectList
COMMENT                               #68=(CFolderPar
COMMENT                                    (CGroupPar
COMMENT                                     (CParagraph 4315 (3 #21# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                      #69=(CLinePar
COMMENT                                           (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                           "Start: 4315  End: 4315" 1)
COMMENT                                      #70=(CLinePar
COMMENT                                           (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                           "Histidine-to-Tyrosine change in
the 806 Light-Chain variable CDR3 region"
COMMENT                                           1))) "HtoY")
COMMENT                                      #71=(CFolderPar
COMMENT                                           (CGroupPar
COMMENT                                            (CParagraph 4716 (3 #22# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                            (CObjectList
COMMENT                                             #72=(CLinePar
COMMENT                                                  (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                                  "Start: 4716  End: 4716" 1)
COMMENT                                             #73=(CLinePar
COMMENT                                                  (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                                  "Light-chain c-region change 2.1-
3" 1)))
COMMENT                                           "Light-Const. chg 2.1-3")))
COMMENT                             "Modified Base (2 total)")
COMMENT                        #74=(CFolderPar
COMMENT                             (CGroupPar (CParagraph 25 (7 25 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                              (CObjectList
COMMENT                               #75=(CFolderPar
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                 (CParagraph 1644 (3 #11# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                 (CObjectList
COMMENT                                  #76=(CLinePar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                       "Start: 1644  End: 1875" 1)))
COMMENT                                "SV40 polyA")
COMMENT                           #77=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                 (CParagraph 4827 (3 #28# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                 (CObjectList
COMMENT                                  #78=(CLinePar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                       "Start: 4827  End: 5063" 1)
COMMENT                                  #79=(CLinePar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                       "SV40 poly A" 1))) "SV40 poly
A")))
COMMENT                           "PolyA Signal (2 total)")
COMMENT                      #80=(CFolderPar
COMMENT                           (CGroupPar (CParagraph 30 (7 30 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                            (CObjectList
COMMENT                             #81=(CFolderPar
COMMENT                                  (CGroupPar
COMMENT                                   (CParagraph 1884 (3 #24# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                   (CObjectList
COMMENT                                    #82=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                         "Start: 1884  End: 2902" 1)
COMMENT                                    #83=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                         "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)"
1)))
COMMENT                                "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)")
COMMENT                           #84=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                 (CParagraph 9784 (3 #15# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                 (CObjectList
COMMENT                                  #85=(CLinePar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                       "Start: 9784  End: 10926" 1)
COMMENT                                  #86=(CLinePar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                       "hCMV-MIE promoter" 1)))
COMMENT                                "Promoter (hCMV-MIE)")))
COMMENT                           "Promoter Prokaryotic (2 total)")
COMMENT                      #87=(CFolderPar
COMMENT                           (CGroupPar (CParagraph 45 (7 45 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                            (CObjectList
COMMENT                             #88=(CFolderPar
COMMENT                                  (CGroupPar
COMMENT                                   (CParagraph 128 (3 #20# 0) 1 2 2 0 194)
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #89=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "Start: 128   End: 542 " 1)))
COMMENT                                 "Heavy Chain 806 V-Region Insert")
COMMENT                            #90=(CFolderPar
COMMENT                                 (CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 3999 (3 #23# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #91=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "Start: 3999  End: 4376" 1)))
COMMENT                                 "Light-Chain 806 V-Region insert")))
COMMENT                       "V-Region (2 total)")
COMMENT                  #92=(CFolderPar
COMMENT                       (CGroupPar (CParagraph 52 (7 52 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                        (CObjectList
COMMENT                         #93=(CFolderPar
COMMENT                              (CGroupPar
COMMENT                               (CParagraph 2903 (3 #27# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                               (CObjectList
COMMENT                                #94=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "Start: 2903  End: 3023" 1)
COMMENT                                #95=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"5'UT"
                                            1))) "5'UTR_1")
COMMENT                            #96=(CFolderPar
COMMENT                                 (CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 3851 (3 #25# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #97=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                        "Start: 3851  End: 3867" 1)
COMMENT                                   #98=(CLinePar
COMMENT                                        (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"5'UT"
                                               1))) "5'UTR_2")
COMMENT                            #99=(CFolderPar
COMMENT                                 (CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 10927 (3 #17# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #100=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                         "Start: 10927  End: 11047" 1)
COMMENT                                   #101=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"5'UT"
                                                1))) "5'UTR_1")
COMMENT                            #102=(CFolderPar
COMMENT                                  (CGroupPar
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                    (CParagraph 11875 (3 #19# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                    (CObjectList
COMMENT                                     #103=(CLinePar
COMMENT                                           (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                           "Start: 11875  End: 11891" 1)
COMMENT                                     #104=(CLinePar
COMMENT                                           (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                           "5'UT" 1))) "5'UTR_2")))
COMMENT                          "5' UTR (4 total)")
COMMENT                        #105=(CFolderPar
COMMENT                              (CGroupPar (CParagraph 53 (7 53 0) 1 1 1 0
178)
COMMENT                               (CObjectList
COMMENT                                #106=(CFolderPar
COMMENT                                      (CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 6121 (3 #13# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #107=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                              "Start: 6121  End: 6981
(Complementary)"
COMMENT                                              1)
COMMENT                                        #108=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                              "beta-lactamase" 1)))
COMMENT                                    "RNA (beta-lactamase) Amp(R)")))
COMMENT                              "RNA - Misc. (1 total)")
COMMENT                        #109=(CFolderPar
COMMENT                              (CGroupPar (CParagraph 54 (7 54 0) 1 1 1 0
178)
COMMENT                               (CObjectList
COMMENT                                #110=(CFolderPar
COMMENT                                      (CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 7707 (3 #14# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #111=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                              "Start: 7707  End: 8906" 1)
COMMENT                                        #112=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                              "GS cDNA" 1))) "mRNA (GS
cDNA)")))
COMMENT                                  "mRNA (1 total)"))) "Feature Map")
COMMENT                    #113=(CFolderPar
COMMENT                          (CGroupPar (CParagraph 13 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #114=(CRSFolderPar
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                         (CFolderPar
COMMENT                          (CGroupPar (CParagraph 37104496 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #115=(CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 0 (10 #0# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #116=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (1 #0# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                         " N1: 5059 " 1))))) "BamHI: 1
site")
COMMENT                        1 5 "GGATCC" "CCTAGG")
COMMENT                   #117=(CRSFolderPar
COMMENT                         (CFolderPar
COMMENT                          (CGroupPar (CParagraph 37104336 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #118=(CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 0 (10 #1# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #119=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (1 #1# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                         " N1: 8910 " 1))))) "BglII: 1
site")
COMMENT                        1 5 "AGATCT" "TCTAGA")
COMMENT                   #120=(CRSFolderPar
COMMENT                         (CFolderPar
COMMENT                          (CGroupPar (CParagraph 18147408 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #121=(CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 0 (10 #2# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                  (CObjectList
COMMENT                                   #122=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (1 #2# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                         " N1: 128 " 1)
COMMENT                                   #123=(CLinePar
COMMENT                                         (CParagraph 0 (1 #2# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                         " N2: 543 " 1))))) "DraIII: 2
sites")
COMMENT                        6 3 "CACNNNGTG" "GTGNNNCAC")
COMMENT                   #124=(CRSFolderPar
COMMENT                         (CFolderPar
COMMENT                          (CGroupPar (CParagraph 37104736 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #125=(CGroupPar
COMMENT                                  (CParagraph 0 (10 #3# 0) 1 2 2 0
180)
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                   (CObjectList
COMMENT                                    #126=(CLinePar
COMMENT                                          (CParagraph 0 (1 #3# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                          " N1: 551 " 1))))) "FseI: 1
site") 6
COMMENT                              2 "GGCCGGCC" "CCGGCCGG")
COMMENT                        #127=(CRSFolderPar
COMMENT                              (CFolderPar
COMMENT                               (CGroupPar (CParagraph 37104576 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #128=(CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (10 #4# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #129=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (1 #4# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                              " N1: 2 " 1)
COMMENT                                        #130=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (1 #4# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                              " N2: 3869 " 1)))))
COMMENT                                "HindIII: 2 sites") 1 5 "AAGCTT" "TTCGAA")
COMMENT                        #131=(CRSFolderPar
COMMENT                              (CFolderPar
COMMENT                               (CGroupPar (CParagraph 27521208 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #132=(CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (10 #5# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #133=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (1 #5# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                              " N1: 9821 " 1)))))) "MluI: 1
site")
COMMENT                              1 5 "ACGCGT" "TGCGCA")
COMMENT                        #134=(CRSFolderPar
COMMENT                              (CFolderPar
COMMENT                               (CGroupPar (CParagraph 37104976 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #135=(CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (10 #6# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #136=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (1 #6# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                              " N1: 1878 " 1)))))) "NotI: 1
site")
COMMENT                              2 6 "GCGGCCGC" "CGCCGGCG")
COMMENT                        #137=(CRSFolderPar
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                              (CFolderPar
COMMENT                               (CGroupPar (CParagraph 37104816 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #138=(CGroupPar
COMMENT                                       (CParagraph 0 (10 #7# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                       (CObjectList
COMMENT                                        #139=(CLinePar
COMMENT                                              (CParagraph 0 (1 #7# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                              " N1: 4387 " 1))))) "PacI: 1
site")
COMMENT                                    5 3 "TTAATTAA" "AATTAATT")
COMMENT                              #140=(CRSFolderPar
COMMENT                                    (CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 37104256 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                      (CObjectList
COMMENT                                       #141=(CGroupPar
COMMENT                                             (CParagraph 0 (10 #8# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                             (CObjectList
COMMENT                                              #142=(CLinePar
COMMENT                                                    (CParagraph 0 (1 #8# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                                    " N1: 3999 " 1)
COMMENT                                              #143=(CLinePar
COMMENT                                                    (CParagraph 0 (1 #8# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                                    " N2: 4377 " 1))))) "RsrII: 2
sites")
COMMENT                                    2 5 "CGGWCCG" "GCCWGGC")
COMMENT                              #144=(CRSFolderPar
COMMENT                                    (CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 18147328 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                      (CObjectList
COMMENT                                       #145=(CGroupPar
COMMENT                                             (CParagraph 0 (10 #9# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                             (CObjectList
COMMENT                                              #146=(CLinePar
COMMENT                                                    (CParagraph 0 (1 #9# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                                    " N1: 5335 " 1))))) "SalI: 1
site")
COMMENT                                    1 5 "GTCGAC" "CAGCTG")))
COMMENT                           "Restriction/Methylation Map"))))
COMMENT                 (CGraphView
COMMENT                  (CWStyleSheet
COMMENT                   (CObjectList
COMMENT                    #147=(CWidgetStyle "RSite Label" 1 (LOGPEN 0 0 13408563) 1 0 1
COMMENT                          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
0 1 5
COMMENT                          "@N (@S)" 0)
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT          #148=(CWidgetStyle "Signal Label" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.666667 0
1 1
COMMENT                "@N" 0)
COMMENT          #149=(CWidgetStyle "Molecule Label 2" 0 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
0 1 16
COMMENT                "@L bp" 0)
COMMENT          #150=(CWidgetStyle "Molecule Label 1" 0 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Verdana") 0.833333
0 1 1
COMMENT                "@N" 0)
COMMENT          #151=(CWidgetStyle "Shape 3" 1 (LOGPEN 0 0 3355545) 1 1
COMMENT                (LOGBRUSH 0 6724095 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT          #152=(CWidgetStyle "Shape 1" 1 (LOGPEN 0 0 6723840) 1 1
COMMENT                (LOGBRUSH 0 10079334 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT          #153=(CWidgetStyle "Axis" 1 (LOGPEN 0 0 10079436) 2 1
COMMENT                (LOGBRUSH 0 13434879 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 10 1 0 0 0))
COMMENT          #154=(CWidgetStyle "Line 2" 1 (LOGPEN 0 0 6723840) 8 0 0 0 1
COMMENT                (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT          #155=(CWidgetStyle "RSite" 1 (LOGPEN 0 0 10053171) 8 0 0 0 1
COMMENT                (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT          #156=(CWidgetStyle "Short Signal" 1 (LOGPEN 0 0 13395507) 10 0
0 0 1
COMMENT                (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT          #157=(CWidgetStyle "Uniq RSite Label" 1 (LOGPEN 0 0 153) 1 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
128 1
COMMENT                5 "@N (@S)" 0)
COMMENT          #158=(CWidgetStyle "Vanilla" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT                (LOGBRUSH 0 16777215 0) 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 18 "Times New Roman")
0.8 0
COMMENT                1 2 "?" 0)
COMMENT          #159=(CWidgetStyle "Mark 1" 0 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 2 7 48 2 2 "Windings") 0.7 0 1
2 "?"
COMMENT                0)
COMMENT          #160=(CWidgetStyle "Motif Label" 1 (LOGPEN 0 0 16744512) 1 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.611111
8388608
COMMENT                1 65535 "@N (@H)" 0)
COMMENT          #161=(CWidgetStyle "Fragment Label 2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 49 "Courier New") 1.05
0 1 48
COMMENT                "@F bp (molecule @L bp)" 0)
COMMENT          #162=(CWidgetStyle "Fragment Label 1" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.91 0 1 1
COMMENT                "Fragment of @N" 0)
COMMENT          #163=(CWidgetStyle "Shape 4" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT                (LOGBRUSH 2 8388608 5) 0 0 0)
COMMENT          #164=(CWidgetStyle "Shape 2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 0
COMMENT                0 0)
COMMENT          #165=(CWidgetStyle "Shape 0" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 0 0
0) 0 0
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                0)
COMMENT              #166=(CWidgetStyle "ORF" 1 (LOGPEN 0 0 16384) 8 0 0 0 1
COMMENT                    (LOGSHAPE 7 0.2 3.41182 2.86186 0.609808))
COMMENT              #167=(CWidgetStyle "Line 4" 1 (LOGPEN 0 0 32768) 8 0 0 0 0)
COMMENT              #168=(CWidgetStyle "Line 3" 1 (LOGPEN 0 0 16711680) 8 0 0 0 0)
COMMENT              #169=(CWidgetStyle "Line 1" 1 (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0 0 0 0)
COMMENT              #170=(CWidgetStyle "Short Promoter" 1 (LOGPEN 0 0 128) 6 0 0 0
0)
COMMENT              #171=(CWidgetStyle "Motif" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT              #172=(CWidgetStyle "Line 0" 1 (LOGPEN 0 0 0) 8 0 0 0 0)
COMMENT              #173=(CWidgetStyle "Void" 0 0 0 0 0)
COMMENT              #174=(CWidgetStyle "General Label" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
0.91 0
COMMENT                    1 3 "@T @N " 0)
COMMENT              #175=(CWidgetStyle "Position" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT              #176=(CWidgetStyle "Annotation" 0 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
0.91 0
COMMENT                    0 0)
COMMENT              #177=(CWidgetStyle "Position Label" 1 (LOGPEN 0 0 8388608) 1 0
1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 1 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
8388608 1 1
COMMENT                    "@N" 0)
COMMENT              #178=(CWidgetStyle "Range" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT                    (LOGBRUSH 0 16777215 0) 0 0 0)
COMMENT              #179=(CWidgetStyle "Range Label" 1 (LOGPEN 0 0 8388608) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 1 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
8388608 1 1
COMMENT                    "@N" 0)
COMMENT              #180=(CWidgetStyle "ORF Label" 1 (LOGPEN 0 0 49216) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
COMMENT                    0.611111 0 1 65535 "@N" 0)
COMMENT              #181=(CWidgetStyle "CDS Label" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.555556
255 1 1
COMMENT                    "@N" 0)
COMMENT              #182=(CWidgetStyle "Shape 5" 1 (LOGPEN 0 0 0) 3 1
COMMENT                    (LOGBRUSH 0 16777113 0) 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0 1
COMMENT                    (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT              #183=(CWidgetStyle "CDS" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 2 39423
3) 0 0
COMMENT                    1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT              #184=(CWidgetStyle "Label 2" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.944444
8388608
COMMENT                    1 1 "@N" 0)
COMMENT              #185=(CWidgetStyle "Label 3" 1 (LOGPEN 0 0 8421376) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 700 255 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.833333
255 1
COMMENT                    5 "@N (@S)" 0)
COMMENT              #186=(CWidgetStyle "Label 4" 1 (LOGPEN 0 0 8437824) 1 0 1
COMMENT                    (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.722222 0
1 5
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                 "@N (@S)" 0)
COMMENT           #187=(CWidgetStyle "Shape 6" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT                 (LOGBRUSH 0 3394713 0) 1
COMMENT                 (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT           #188=(CWidgetStyle "Shape 7" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT                 (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1
COMMENT                 (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT           #189=(CWidgetStyle "Shape 8" 1 (LOGPEN 0 0 52275) 1 1
COMMENT                 (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1
COMMENT                 (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT           #190=(CWidgetStyle "Shape 9" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT                 (LOGBRUSH 0 10040064 0) 1
COMMENT                 (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0))
COMMENT          0.164644 1.74233 0.164644 2.53336
COMMENT          (2 (CShapeMapEntry 0 "Shape 9" 1 "Signal Label") 45
COMMENT           (CShapeMapEntry 0 "Shape 8" 1 "Signal Label") 70
COMMENT           (CShapeMapEntry 0 "Unique RSite" 1 "Uniq RSite Label") 67
COMMENT           (CShapeMapEntry 0 "ORF" 0 "ORF Label")) 40.0378 40.0378 39 39
0.1
COMMENT          -11891) 1 0 1 1 1
COMMENT         (mapper: 26.6862 -31.9823 39 39 0.01 10 14 11891 11891 1 0 0)
COMMENT         #191=(CGroupWidget (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 Nil -317 100)
COMMENT               (CObjectList
COMMENT                #192=(CGroupWidget (CWidget 1 (0 0) 1 2 0 0 Nil -639 100)
COMMENT                      (CObjectList
COMMENT                       #193=(CAxis
COMMENT                             (CWideLine
COMMENT                              (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #153# 37106252 0)
COMMENT                              (LOGPEN 0 0 10079436) 2 (LOGBRUSH 0 13434879
0) 1
COMMENT                              6.27471 6.27271 1 0.0214037) 0.0527557)
COMMENT                       #194=(CLabel
COMMENT                             (CWidget 1001 (0 0) 1 2 0 0 #150# 28370780
100)
COMMENT                             (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                             (LOGFONT 41 15 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34
"Verdana")
COMMENT                             2.53336 0.833333 0 "8C65AAG" "@N" 1 0 0.5 0 -
6.206
COMMENT                             3.84615 1.07692 Nil)
COMMENT                       #195=(CLabel (CWidget 1002 (0 0) 1 2 0 0 #149# 0
100)
COMMENT                             (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                             (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18
"Georgia")
COMMENT                             2.53336 0.555556 0 "11891 bp" "@L bp" 16 0 -
0.8 0
COMMENT                             -7.47268 2.30769 0.692308 Nil))
(CObjectList))
COMMENT                #196=(CGroupWidget (CWidget 10 (6 0) 1 2 0 0 Nil 393219
100)
COMMENT                      (CObjectList
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                    #197=(CGroupWidget
COMMENT                          (CWidget 2 (7 2 0) 1 2 0 0 Nil -108 100)
COMMENT                          (CObjectList
COMMENT                           #198=(CWideArrow
COMMENT                                 (CWideLine
COMMENT                                  (CWidget 0 (3 #10# 0) 1 2 0 0 #190# 0
100)
COMMENT                                  (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0 10040064
0) 1
COMMENT                                  5.40641 5.98197 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                           #199=(CLabel
COMMENT                                 (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37745700 100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                 (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                 "GeneArt HC C-Reg" "@N" 1 0 0 -15.0455
COMMENT                                 8.30913 6.28205 0.846154 #198#)
COMMENT                           #200=(CWideArrow
COMMENT                                 (CWideLine
COMMENT                                  (CWidget 0 (3 #29# 0) 1 2 0 0 #190#
393235
COMMENT                                   100) (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                  (LOGBRUSH 0 10040064 0) 1 3.74091
3.95774 1
COMMENT                                  0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                           #201=(CLabel
COMMENT                                 (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
28396148 100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                 (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                 "Codon-Optimized Kappa Constant
Region" "@N"
COMMENT                                 1 0 0 -11.1884 24.776 14.4872 0.846154
#200#))
COMMENT                          (CObjectList))
COMMENT                    #202=(CGroupWidget
COMMENT                          (CWidget 15 (7 15 0) 1 2 0 0 Nil 18088376
100)
COMMENT                          (CObjectList
COMMENT                           #203=(CLine
COMMENT                                 (CWidget 0 (3 #16# 0) 1 2 0 0 #169#
18088384
COMMENT                                  100) (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
COMMENT                                 1.12422 1.5737)
COMMENT                           #204=(CLabel
COMMENT                                 (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088512 100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                 (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                    "Intron (SV40 intron + poly A)" "@N" 1
0 0
COMMENT                                    13.1146 8.30913 9.74359 0.846154
#203#)
COMMENT                                 #205=(CLine
COMMENT                                    (CWidget 0 (3 #18# 0) 1 2 0 0 #169# -
1215 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
0.00896848
COMMENT                                    0.445258)
COMMENT                                 #206=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
27471448 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "Intron
1" "@N"
COMMENT                                    1 0 0 14.7731 3.24241 2.74359 0.846154
#205#)
COMMENT                                 #207=(CLine
COMMENT                                    (CWidget 0 (3 #26# 0) 1 2 0 0 #169#
268634520
COMMENT                                     100) (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
COMMENT                                    4.24209 4.67838)
COMMENT                                 #208=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37615420 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "Intron
1" "@N"
COMMENT                                    1 0 0 -7.95233 14.6425 2.74359
0.846154 #207#))
COMMENT                                 (CObjectList))
COMMENT                              #209=(CGroupWidget
COMMENT                                 (CWidget 21 (7 21 0) 1 2 0 0 Nil 327685 100)
COMMENT                                 (CObjectList
COMMENT                                  #210=(CWideArrow
COMMENT                                    (CWideLine
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #12# 0) 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                     (LOGBRUSH 0 10079334 0) 1 2.21152
2.393 1
COMMENT                                     0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                  #211=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088608 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                    "Signal (SV40E (and SV40 ori))" "@N" 1
0 0
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                 8.88505 12.1092 10.0513 0.846154
#210#))
COMMENT                          (CObjectList))
COMMENT                    #212=(CGroupWidget
COMMENT                          (CWidget 23 (7 23 0) 1 2 0 0 Nil 27986056
100)
COMMENT                          (CObjectList
COMMENT                           #213=(CShape
COMMENT                                 (CWidget 0 (3 #21# 0) 1 2 0 0 #172# 0
100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 6 0) 8 (LOGBRUSH 0 0 4)
0.835356
COMMENT                                 3.9973 0.7 2)
COMMENT                           #214=(CLabel
COMMENT                                 (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37029036 100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                 (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0 "HtoY"
"@N" 1 0
COMMENT                                 0 -5.40373 20.9759 1.64103 0.846154
#213#)
COMMENT                           #215=(CShape
COMMENT                                 (CWidget 0 (3 #22# 0) 1 2 0 0 #172# 0
100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 6 0) 8 (LOGBRUSH 0 0 4)
0.835356
COMMENT                                 3.78575 0.7 2)
COMMENT                           #216=(CLabel
COMMENT                                 (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088616 100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                 (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                 "Light-Const. chg 2.1-3" "@N" 1 0 0 -
7.491
COMMENT                                 26.0426 7.64103 0.846154 #215#))
COMMENT                          (CObjectList))
COMMENT                    #217=(CGroupWidget
COMMENT                          (CWidget 25 (7 25 0) 1 2 0 0 Nil -736 100)
COMMENT                          (CObjectList
COMMENT                           #218=(CLine
COMMENT                                 (CWidget 0 (3 #11# 0) 1 2 0 0 #167#
18088376
COMMENT                                  100) (LOGPEN 0 6 32768) 8 0.835356
5.28402
COMMENT                                 5.40641)
COMMENT                           #219=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
0 100)
COMMENT                                 (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                 (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0 "SV40
polyA"
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                    "@N" 1 0 0 -12.2962 9.57581 3.79487
0.846154
COMMENT                                    #218#)
COMMENT                                #220=(CLine
COMMENT                                    (CWidget 0 (3 #28# 0) 1 2 0 0 #167#
18088384
COMMENT                                     100) (LOGPEN 0 6 32768) 8 0.670712
3.60216
COMMENT                                    3.72719)
COMMENT                                #221=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37126836 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "SV40
poly A"
COMMENT                                    "@N" 1 0 0 -5.16093 27.3093 4.02564
0.846154
COMMENT                                    #220#)) (CObjectList))
COMMENT                            #222=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 30 (7 30 0) 1 2 0 0 Nil 18088376
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #223=(CWideArrow
COMMENT                                    (CWideLine
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #15# 0) 1 2 0 0 #164#
28358516
COMMENT                                      100) (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 1
COMMENT                                     0.509093 1.11209 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                                 #224=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088512 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                    "Promoter (hCMV-MIE)" "@N" 1 0 0
14.3466
COMMENT                                    5.77577 7.25641 0.846154 #223#)
COMMENT                                 #225=(CWideArrow
COMMENT                                    (CWideLine
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #24# 0) 1 2 0 0 #164#
196625
COMMENT                                      100) (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 1
COMMENT                                     4.74221 5.27979 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                                 #226=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37176452 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                  "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                 "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)" "@N"
1 0 0
COMMENT                                 -14.5466 12.1092 11.1795 0.846154
#225#))
COMMENT                           (CObjectList))
COMMENT                         #227=(CGroupWidget
COMMENT                           (CWidget 45 (7 45 0) 1 2 0 0 Nil -1015 100)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #228=(CWideArrow
COMMENT                                  (CWideLine
COMMENT                                   (CWidget 0 (3 #20# 0) 1 2 0 0 #189#
37110564
COMMENT                                    100) (LOGPEN 0 0 52275) 1
COMMENT                                   (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1 5.98725
6.20619 1
COMMENT                                   0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                  #229=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
0 100)
COMMENT                                  (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                  (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                   "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                  "Heavy Chain 806 V-Region Insert" "@N"
1 0 0
COMMENT                                  -19.2693 4.50909 11.2564 0.846154
#228#)
COMMENT                                  #230=(CWideArrow
COMMENT                                  (CWideLine
COMMENT                                   (CWidget 0 (3 #23# 0) 1 2 0 0 #189#
37186028
COMMENT                                    100) (LOGPEN 0 0 52275) 1
COMMENT                                   (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1 3.96459
4.16401 1
COMMENT                                   0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                  #231=(CLabel
COMMENT                                  (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088608 100)
COMMENT                                  (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                  (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                   "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                  "Light-Chain 806 V-Region insert" "@N"
1 0 0
COMMENT                                  -10.3851 19.7092 11.0256 0.846154
#230#))
COMMENT                           (CObjectList))
COMMENT                         #232=(CGroupWidget
COMMENT                           (CWidget 52 (7 52 0) 1 2 0 0 Nil 18088352
100)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #233=(CLine
COMMENT                                  (CWidget 0 (3 #17# 0) 1 2 0 0 #154#
37060948
COMMENT                                   100) (LOGPEN 0 6 6723840) 8 0.835356
COMMENT                                  0.445258 0.509093)
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT
COMMENT
18088512 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
COMMENT
#233#)
COMMENT
COMMENT
100)
COMMENT
1.9
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088528 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
COMMENT
#235#)
COMMENT
COMMENT
100)
COMMENT
0.082322
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088600 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
COMMENT
#237#)
COMMENT
COMMENT
268634520
COMMENT
4.67838
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088584 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
```

```
#234=(CLabel
      (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#

      (LOGPEN 0 0 0) 1
      (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1

       "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 1"

      0 0 13.5592 4.50909 2.61538 0.846154

#235=(CScratch
      (CWidget 0 (3 #19# 0) 1 2 0 0 #154# 0

      (LOGPEN 0 6 6723840) 8 1 0.00896848

      0.082322 1)
#236=(CLabel
      (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#

      (LOGPEN 0 0 0) 1
      (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1

       "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 2"

      0 0 15.7121 1.97573 2.61538 0.846154

#237=(CScratch
      (CWidget 0 (3 #25# 0) 1 2 0 0 #154# 0

      (LOGPEN 0 6 6723840) 8 1 4.24209 1.9

      1)
#238=(CLabel
      (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#

      (LOGPEN 0 0 0) 1
      (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1

       "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 2"

      0 0 -6.94704 15.9092 2.61538 0.846154

#239=(CLine
      (CWidget 0 (3 #27# 0) 1 2 0 0 #154#

       100) (LOGPEN 0 6 6723840) 8 0.835356

      4.74221)
#240=(CLabel
      (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#

      (LOGPEN 0 0 0) 1
      (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1

       "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 1"
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                    0 0 -8.96711 13.3758 2.61538 0.846154
#239#))
COMMENT                              (CObjectList))
COMMENT                         #241=(CGroupWidget
COMMENT                              (CWidget 53 (7 53 0) 1 2 0 0 Nil 18088360
100)
COMMENT                              (CObjectList
COMMENT                               #242=(CWideArrow
COMMENT                                    (CWideLine
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #13# 0) 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                     (LOGBRUSH 0 10079334 0) 1 2.59031
3.04453 1
COMMENT                                     0.082322) 0.8 1.8 1)
COMMENT                                    #243=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088592 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                    "RNA (beta-lactamase) Amp(R)" "@N" 1 0
0
COMMENT                                    6.3624 13.3758 9.74359 0.846154
#242#))
COMMENT                              (CObjectList))
COMMENT                         #244=(CGroupWidget
COMMENT                              (CWidget 54 (7 54 0) 1 2 0 0 Nil 268634520
100)
COMMENT                              (CObjectList
COMMENT                               #245=(CWideArrow
COMMENT                                    (CWideLine
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #14# 0) 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                     (LOGBRUSH 0 10079334 0) 1 1.57476
2.20783 1
COMMENT                                     0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                    #246=(CLabel
COMMENT                                    (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088520 100)
COMMENT                                    (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                    (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "mRNA (GS
cDNA)"
COMMENT                                    "@N" 1 0 0 8.63373 10.8425 5.76923
0.846154
COMMENT                                    #245#)) (CObjectList))) (CObjectList))
COMMENT                    #247=(CGroupWidget (CWidget 11 (8 0) 1 2 0 0 Nil -1088
100)
COMMENT                           (CObjectList
COMMENT                            #248=(CGroupWidget
COMMENT                              (CWidget 1 (10 #0# 0) 1 2 0 0 Nil -1227 100)
COMMENT                              (CObjectList
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                 #249=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 1 (1 #0# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322
COMMENT                                       1)
COMMENT                                 #250=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
0 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                       (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                        "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                       "{\\i Bam}HI (5059)" "@N (@S)" 5 0 0 -
4.92823
COMMENT                                       28.576 4.07692 0.692308 #249#))
(CObjectList))
COMMENT                               #251=(CGroupWidget
COMMENT                                 (CWidget 1 (10 #1# 0) 1 2 0 0 Nil 678 100)
COMMENT                                 (CObjectList
COMMENT                                  #252=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 1 (1 #1# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 1.57318 1.9
COMMENT                                       0.082322 1)
COMMENT                                  #253=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
0 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                       (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                        "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                       "{\\i Bgl}II (8910)" "@N (@S)" 5 0 0
8.917
COMMENT                                       9.57581 3.41026 0.692308 #252#))
COMMENT                                 (CObjectList))
COMMENT                               #254=(CGroupWidget
COMMENT                                 (CWidget 1 (10 #3# 0) 1 2 0 0 Nil -320 100)
COMMENT                                 (CObjectList
COMMENT                                  #255=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 1 (1 #3# 1) 1 2 0 0 #155# 669
100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.98303 1.9
COMMENT                                       0.082322 1)
COMMENT                                  #256=(CLabel
COMMENT                                       (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
18146168 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                       (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                        "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                       "{\\i Fse}I (551)" "@N (@S)" 5 0 0 -
14.4711
COMMENT                                       7.04245 2.64103 0.692308 #255#))
COMMENT                                 (CObjectList))
COMMENT                               #257=(CGroupWidget
COMMENT                                 (CWidget 1 (10 #5# 0) 1 2 0 0 Nil 1368 100)
COMMENT                                 (CObjectList
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                          #258=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #5# 1) 1 2 0 0 #155#
1170 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 1.09257 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                          #259=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37574220 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                 "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Mlu}I (9821)" "@N (@S)" 5 0 0
11.05
COMMENT                                7.04245 3.25641 0.692308 #258#))
COMMENT                          (CObjectList))
COMMENT                    #260=(CGroupWidget
COMMENT                          (CWidget 1 (10 #6# 0) 1 2 0 0 Nil -739 100)
COMMENT                          (CObjectList
COMMENT                           #261=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #6# 1) 1 2 0 0 #155# 898
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.28296 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                           #262=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37173948 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                 "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Not}I (1878)" "@N (@S)" 5 0 0 -
11.7199
COMMENT                                10.8425 3.17949 0.692308 #261#))
COMMENT                          (CObjectList))
COMMENT                    #263=(CGroupWidget
COMMENT                          (CWidget 1 (10 #7# 0) 1 2 0 0 Nil 27987292
100)
COMMENT                          (CObjectList
COMMENT                           #264=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #7# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.95932 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                           #265=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37188964 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                 "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Pac}I (4387)" "@N (@S)" 5 0 0 -
6.086
COMMENT                                23.5093 3.33333 0.692308 #264#))
COMMENT                          (CObjectList))
COMMENT                    #266=(CGroupWidget
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                         (CWidget 1 (10 #9# 0) 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                         (CObjectList
COMMENT                          #267=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #9# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.45919 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                          #268=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
18088352 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                 "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Sal}I (5335)" "@N (@S)" 5 0 0 -
3.73591
COMMENT                                29.8427 2.94872 0.692308 #267#))
COMMENT                         (CObjectList))
COMMENT                    #269=(CGroupWidget
COMMENT                         (CWidget 2 (10 #2# 0) 1 2 0 0 Nil -181 100)
COMMENT                         (CObjectList
COMMENT                          #270=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #2# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 6.20619 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                          #271=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147# 393229
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                 "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "{\\i Dra}III (128)" "@N (@S)" 5 0 0 -
15.8185
COMMENT                                3.24241 3.41026 0.692308 #270#)
COMMENT                          #272=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 2 (1 #2# 2) 1 2 0 0 #155# 508
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.98725 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                          #273=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147# 945
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                 "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "{\\i Dra}III (543)" "@N (@S)" 5 0 0 -
14.9124
COMMENT                                5.77577 3.48718 0.692308 #272#))
COMMENT                         (CObjectList))
COMMENT                    #274=(CGroupWidget
COMMENT                         (CWidget 2 (10 #4# 0) 1 2 0 0 Nil 678 100)
COMMENT                         (CObjectList
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                 #275=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 1 (1 #4# 1) 1 2 0 0 #155#
1393 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 6.27266 1.9
COMMENT                                       0.082322 1)
COMMENT                                 #276=(CLabel
COMMENT                                       (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
37174492 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                       (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                        "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                       "{\\i Hin}dIII (2)" "@N (@S)" 5 0 0 -
15.9515
COMMENT                                       1.97573 3.10256 0.692308 #275#)
COMMENT                                 #277=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 2 (1 #4# 2) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 4.23259 1.9
COMMENT                                       0.082322 1)
COMMENT                                 #278=(CLabel
COMMENT                                       (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
28387876 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                       (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                        "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                       "{\\i Hin}dIII (3869)" "@N (@S)" 5 0 0
COMMENT                                       -7.71376 17.1759 4.23077 0.692308
#277#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                           #279=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 2 (10 #8# 0) 1 2 0 0 Nil 1 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                 #280=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 1 (1 #8# 1) 1 2 0 0 #155#
37028212
COMMENT                                        100) (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1
4.16401 1.9
COMMENT                                       0.082322 1)
COMMENT                                 #281=(CLabel
COMMENT                                       (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
28372436 100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                       (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                        "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                       "{\\i Rsr}II (3999)" "@N (@S)" 5 0 0 -
7.08453
COMMENT                                       18.4426 3.5641 0.692308 #280#)
COMMENT                                 #282=(CScratch
COMMENT                                       (CWidget 2 (1 #8# 2) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                       (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.96459 1.9
COMMENT                                       0.082322 1)
COMMENT                                 #283=(CLabel
```

FIG.64 (tiếp)

```
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
28374716 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                      "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Rsr}II (4377)" "@N (@S)" 5 0 0 -
6.14723
COMMENT                                     22.2426 3.41026 0.692308 #282#))
COMMENT                                (CObjectList))) (CObjectList))
COMMENT                #284=(CGroupWidget (CWidget 14 (16 0) 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                      (CObjectList) (CObjectList))
COMMENT                #285=(CGroupWidget (CWidget 12 (0 0) 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                      (CObjectList) (CObjectList))) (CObjectList)))
COMMENT        (CSeqView 10 10 (CObjectList) (CObList) 1 (CObList)) (CObList)
1095072823
COMMENT        (CStringList) 1145656400 2084918081 (CObList)))
FEATURES              Location/Qualifiers
     C_region         553..1643
                      /vntifkey="2"
                      /label=GeneArt\HC\C-Reg
                      /note="GeneArt human HC C-Reg"
     polyA_signal     1644..1875
                      /vntifkey="25"
                      /label=SV40\polyA
     misc_feature     7356..7699
                      /vntifkey="21"
                      /label=Signal\(SV40E\(and\SV40\ori))
                      /note="SV40E (and SV40 ori)"
     misc_RNA         complement(6121..6981)
                      /vntifkey="53"
                      /label=RNA\(beta-lactamase)\Amp(R)
                      /note="beta-lactamase"
     mRNA             7707..8906
                      /vntifkey="54"
                      /label=mRNA\(GS\cDNA)
                      /note="GS cDNA"
     promoter         9784..10926
                      /vntifkey="30"
                      /label=Promoter\(hCMV-MIE)
                      /note="hCMV-MIE promoter"
     intron           8909..9760
                      /vntifkey="15"
                      /label=Intron\(SV40\intron\+\poly\A)
                      /note="SV40 intron + poly A"
     5'UTR            10927..11047
                      /vntifkey="52"
                      /label=5'UTR_1
                      /note="5'UT"
     intron           11048..11874
                      /vntifkey="15"
                      /label=Intron_1
                      /note="intron"
     5'UTR            11875..11891
```

FIG.64 (tiếp)

```
                     /vntifkey="52"
                     /label=5'UTR_2
                     /note="5'UT"
     V_region        128..542
                     /vntifkey="45"
                     /label=Heavy\Chain\806\V-Region\Insert
     modified_base   4315..4315
                     /vntifkey="23"
                     /label=HtoY
                     /note="Histidine-to-Tyrosine change in the 806 Light-Chain
variable CDR3 region"
     modified_base   4716..4716
                     /vntifkey="23"
                     /label=Light-Const.\chg\2.1-3
                     /note="Light-chain c-region change 2.1-3"
     V_region        3999..4376
                     /vntifkey="45"
                     /label=Light-Chain\806\V-Region\insert
     promoter        1884..2902
                     /vntifkey="30"
                     /label=Promoter\(hCMV-MIE)\(from\NotI)
                     /note="Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)"
     5'UTR           3851..3867
                     /vntifkey="52"
                     /label=5'UTR_2
                     /note="5'UT"
     intron          3024..3850
                     /vntifkey="15"
                     /label=Intron_1
                     /note="intron"
     5'UTR           2903..3023
                     /vntifkey="52"
                     /label=5'UTR_1
                     /note="5'UT"
     polyA_signal    4827..5063
                     /vntifkey="25"
                     /label=SV40\poly\A
                     /note="SV40 poly A"
     C_region        4390..4800
                     /vntifkey="2"
                     /label=Codon-Optimized\Kappa\Constant\Region
BASE COUNT     3000 a      3039 c      2868 g      2984 t
ORIGIN
        1 aagcttgccg ccaccatgga ttggacctgg cgcattctct ttctggtagc agccgccaca
       61 ggtaaggggc tgccaaatcc cagtgaggag gaagggatcg aaggtcacca tcgaagccag
      121 tcacccagtg aaggggggctt ccatccactc ctgtgtcttc tctacaggtg tccacagcca
      181 ggtgcagctc caagagagtg gacctgggct tgtcaagccg agtcaaactt tgtccctaac
      241 atgtactgtg tccggatact ctatctcatc agattttgcg tggaattgga taaggcagcc
      301 accagggaaa ggtttagaat ggatgggcta catatcatac tctgggaaca ccagatatca
      361 accttctctg aaaagccgga tcacaatctc aagggacacg tcgaagaatc agttcttcct
      421 gaaactgaac tccgttacag ccgcagacac agcaacatat tactgcgtaa ccgctggcag
      481 aggcttcccc tattggggac agggcaccct agtgacagtg agcagcggta agatggcaca
      541 ccgtggccgg cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac accgcggtca catggcacct
      601 tttctcttcc agcctccacc aagggcccca gcgtgttccc cctggccccc agcagcaaga
      661 gcaccagcgg cggcacagcc gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg
      721 tgaccgtgag ctggaacagc ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc
```

FIG.64 (tiếp)

```
 781 tgcagagcag cggcctgtac agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg
 841 gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga
 901 aggtggagcc caagagctgc gacaagaccc acacctgccc cccctgccca gccccagagc
 961 tgctgggcgg accctccgtg ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca
1021 gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaggac ccagaggtga
1081 agttcaattg gtatgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag
1141 agcagtacaa cagcacctac agggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc
1201 tgaacggcaa ggaatacaaa tgcaaggtct ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaaa
1261 agaccatcag caaggccaag ggccagccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccccct
1321 cccgggacga gtgcaccaag aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc
1381 ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca
1441 ccccccccagt gctggacagc gacggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca
1501 agagcaggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca
1561 accactacac ccagaagagc ctgagcctgt cccccggcaa gtgatgacga cgcggccgtg
1621 cggacgaccg aattcattga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc
1681 tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt
1741 tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt
1801 cacaaataaa gcatttttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt
1861 atcttatcat gtctggcggc cgccgatatt tgaaaatatg gcatattgaa aatgtcgccg
1921 atgtgagttt ctgtgtaact gatatcgcca tttttccaaa agtgattttt gggcatacgc
1981 gatatctggc gatagcgctt atatcgttta cgggggatgg cgatagacga ctttggtgac
2041 ttgggcgatt ctgtgtgtcg caaatatcgc agtttcgata taggtgacag acgatatgag
2101 gctatatcgc cgatagaggc gacatcaagc tggcacatgg ccaatgcata tcgatctata
2161 cattgaatca atattggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata
2221 ttggctattg gccattgcat acgttgtatc catatcataa tatgtacatt tatattggct
2281 catgtccaac attaccgcca tgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa
2341 ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa
2401 atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg
2461 ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt
2521 aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg
2581 tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc
2641 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc
2701 agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca
2761 ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta
2821 acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa
2881 gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc
2941 tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc
3001 ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccacccccct
3061 tggcttctta tgcatgctat actgtttttg gcttggggtc tatacacccc cgcttcctca
3121 tgttataggt gatggtatag cttagcctat aggtgtgggt tattgaccat tattgaccac
3181 tcccctattg gtgacgatac tttccattac taatccataa catggctctt tgccacaact
3241 ctctttattg gctatatgcc aatacactgt ccttcagaga ctgacacgga ctctgtattt
3301 ttacaggatg gggtctcatt tattatttac aaattcacat atacaacacc accgtcccca
3361 gtgcccgcag tttttattaa acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt
3421 ccggacatgg gctcttctcc ggtagcggcg gagcttctac atccgagccc tgctcccatg
3481 cctccagcga ctcatggtcg ctcggcagct ccttgctcct aacagtggag gccagactta
3541 ggcacagcac gatgcccacc accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtagggtatg
3601 tgtctgaaaa tgagctcggg gagcgggctt gcaccgctga cgcatttgga agacttaagg
3661 cagcggcaga agaagatgca ggcagctgag ttgttgtgtt ctgataagag tcagaggtaa
3721 ctcccgttgc ggtgctgtta acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcgttgctg
3781 ccgcgcgcgc caccagacat aatagctgac agactaacag actgttcctt tccatgggtc
3841 ttttctgcag tcaccgtcct tgacacgaag cttgccgcca ccatggattg gacttggaga
3901 atactgtttc ttgtagcagc cgcaacaggt aaggggctgc caaatcccag tgaggaggaa
3961 gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca agggggcgga ccgcttccat ccactcctgt
4021 gtcttctcta caggtgttca cagtgatatt cagatgactc agagtccatc cagcatgtca
4081 gtctccgtgg gagatagggt gacgataacc tgtcattcaa gccaagacat caactccaat
```

FIG.64 (tiếp)

```
4141 attggatggc tccaacagaa gcctggtaag tccttcaaag gactaatcta tcacggaaca
4201 aacttggacg acggcgtgcc atcgagattt tcagggtctg gcagcgggac cgactataca
4261 ctgaccatct ctagcttaca accagaggac tttgccacat actactgcgt ccagtacgct
4321 cagttcccct ggacattcgg cggcggcaca aaactggaaa tcaaacgtga gtagcggtcc
4381 gttaattaaa gatccttcta aactctgagg gggtcggatg acgtggccat tgttacttaa
4441 acaccatcct gtttgcttct ttcctcagga accgtcgcag ctccctccgt gttcatcttc
4501 cccccatccg acgagcaact gaagtcaggc acagcctccg tggtgtgcct ccttaataac
4561 ttttacccaa gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca acgcactaca gagcgggaac
4621 tctcaggaaa gcgtgacaga gcaggactca aaagattcaa catacagcct atcttctacc
4681 ctgacactgt caaaagctga ttatgaaaag cacaaagtat atgcctgtga agtaactcat
4741 cagggactca gcagccctgt cactaaaagt tttaatagag gcgaatgctg ataagcggcc
4801 gtgcggacga ccgaattcat tgatcataat cagccatacc acatttgtag aggttttact
4861 tgctttaaaa aacctcccac acctcccccc gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt
4921 tgttgttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa
4981 tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa
5041 tgtatcttat catgtctgga tcctctacgc cggacgcatc gtggccggca tcaccggcgc
5101 cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg
5161 ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg
5221 gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg
5281 cctcaaccta ctactgggct gcttcctaat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgacc
5341 tcgggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa
5401 tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc
5461 ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc
5521 cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag
5581 ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga
5641 ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc
5701 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac
5761 agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg
5821 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca
5881 aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa
5941 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa
6001 ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt
6061 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag
6121 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat
6181 agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc
6241 cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa
6301 ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca
6361 gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa
6421 cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt
6481 cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc
6541 ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact
6601 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc
6661 tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg
6721 ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct
6781 catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc
6841 cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag
6901 cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac
6961 acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg
7021 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt
7081 tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac
7141 attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctgatgg ctctttgcgg cacccatcgt
7201 tcgtaatgtt ccgtggcacc gaggacaacc ctcaagagaa aatgtaatca cactggctca
7261 ccttcgggtg ggcctttctg cgtttataag gagacacttt atgtttaaga aggttggtaa
7321 attccttgcg gctttggcag ccaagctaga tccggctgtg gaatgtgtgt cagttagggt
7381 gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt
7441 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc
```

FIG.64 (tiếp)

```
 7501 atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc
 7561 cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat ttttttttatt tatgcagagg
 7621 ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc
 7681 taggcttttg caaaaagcta gcttggggcc accgctcaga gcaccttcca ccatggccac
 7741 ctcagcaagt tcccacttga acaaaaacat caagcaaatg tacttgtgcc tgccccaggg
 7801 tgagaaagtc caagccatgt atatctgggt tgatggtact ggagaaggac tgcgctgcaa
 7861 aacccgcacc ctggactgtg agcccaagtg tgtagaagag ttacctgagt ggaattttga
 7921 tggctctagt acctttcagt ctgagggctc caacagtgac atgtatctca gccctgttgc
 7981 catgtttcgg gacccttcc gcagagatcc caacaagctg gtgttctgtg aagttttcaa
 8041 gtacaaccgg aagcctgcag agaccaattt aaggcactcg tgtaaacgga taatggacat
 8101 ggtgagcaac cagcacccct ggtttggaat ggaacaggag tatactctga tgggaacaga
 8161 tgggcaccct tttggttggc cttccaatgg ctttcctggg ccccaaggtc cgtattactg
 8221 tggtgtgggc gcagacaaag cctatggcag ggatatcgtg gaggctcact accgcgcctg
 8281 cttgtatgct ggggtcaaga ttacaggaac aaatgctgag gtcatgcctg cccagtggga
 8341 actccaaata ggaccctgtg aaggaatccg catgggagat catctctggg tggcccgttt
 8401 catcttgcat cgagtatgtg aagactttgg ggtaatagca acctttgacc ccaagcccat
 8461 tcctgggaac tggaatggtg caggctgcca taccaacttt agcaccaagg ccatgcggga
 8521 ggagaatggt ctgaagcaca tcgaggaggc catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggta
 8581 ccacattcga gcctacgatc ccaaggggg cctggacaat gcccgtggtc tgactgggtt
 8641 ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc tgctggtgtc gccaatcgca gtgccagcat
 8701 ccgcattccc cggactgtcg gccaggagaa gaaaggttac tttgaagacc gcggcccctc
 8761 tgccaattgt gacccctttg cagtgacaga agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga
 8821 gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa ctaattagac tttgagtgat cttgagcctt
 8881 tcctagttca tcccaccccg ccccagagag atctttgtga aggaacctta cttctgtggt
 8941 gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt
 9001 ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc
 9061 tatggaactg atgaatggga gcagtggtgg aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc
 9121 tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct
 9181 ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt
 9241 ttgagtcatg ctgtgtttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta caccacaaag
 9301 gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac ctttataagt
 9361 aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag gcatagagtg
 9421 tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat ttgtaaaggg
 9481 gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca gccataccac
 9541 atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca
 9601 taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata
 9661 aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg
 9721 tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc tagcttcgtg tcaaggacgg
 9781 tgactgcagt gaataataaa atgtgtgttt gtccgaaata cgcgttttga gatttctgtc
 9841 gccgactaaa ttcatgtcgc gcgatagtgg tgtttatcgc cgatagagat ggcgatattg
 9901 gaaaaatcga tatttgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc gccgatgtga gtttctgtgt
 9961 aactgatatc gccatttttc caaaagtgat ttttgggcat acgcgatatc tggcgatagc
10021 gcttatatcg tttacggggg atggcgatag acgactttgg tgacttgggc gattctgtgt
10081 gtcgcaaata tcgcagtttc gatataggtg acagacgata tgaggctata tcgccgatag
10141 aggcgacatc aagctggcac atggccaatg catatcgatc tatacattga atcaatattg
10201 gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc aatattggct attggccatt
10261 gcatacgttg tatccatatc ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caacattacc
10321 gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt
10381 tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg
10441 accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc
10501 aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc
10561 agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg
10621 gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat
10681 ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg
10741 tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag
10801 tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt
```

FIG.64 (tiếp)

```
10861 gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt
10921 gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg
10981 ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga acgcggattc cccgtgccaa
11041 gagtgacgta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc cccttggctt cttatgcatg
11101 ctatactgtt tttggcttgg ggtctataca cccccgcttc ctcatgttat aggtgatggt
11161 atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga ccactcccct attggtgacg
11221 atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggctata
11281 tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct
11341 catttattat ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc cccagtgccc gcagttttta
11401 ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcgggtacg tgttccggac atgggctctt
11461 ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc catgcctcca gcgactcatg
11521 gtcgctcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc
11581 caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct
11641 cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga
11701 tgcaggcagc tgagttgttg tgttctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct
11761 gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag
11821 acataatagc tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg
11881 tccttgacac g
//
```

FIG.64 (tiếp)

Chuỗi nhẹ

CDR1-806 $_{23}$HSSQDINSNIG
CDR1-175 $_{23}$HSSQDISSNIG
CDR2-806 $_{49}$YHGTNLDD
CDR2-175 $_{49}$YHGTNLED
CDR3-806 $_{89}$VQYAQFPWT
CDR3-175 $_{89}$VQYGQFPWT

Chuỗi nặng

CDR1-806 $_{31}$SDFAWN
CDR1-175 $_{31}$SDYAWN
CDR2-806 $_{51}$YISYSGNTRYNPSLKS
CDR2-175 $_{51}$YISYSANTRYNPSLKS
CDR3-806 $_{97}$VTAGRGFPY
CDR3-175 $_{97}$ATAGRGFPY

Số của gốc đầu tiên được nêu
Các gốc được gạch chân là các gốc tiếp xúc với EGFR287-302

FIG.65

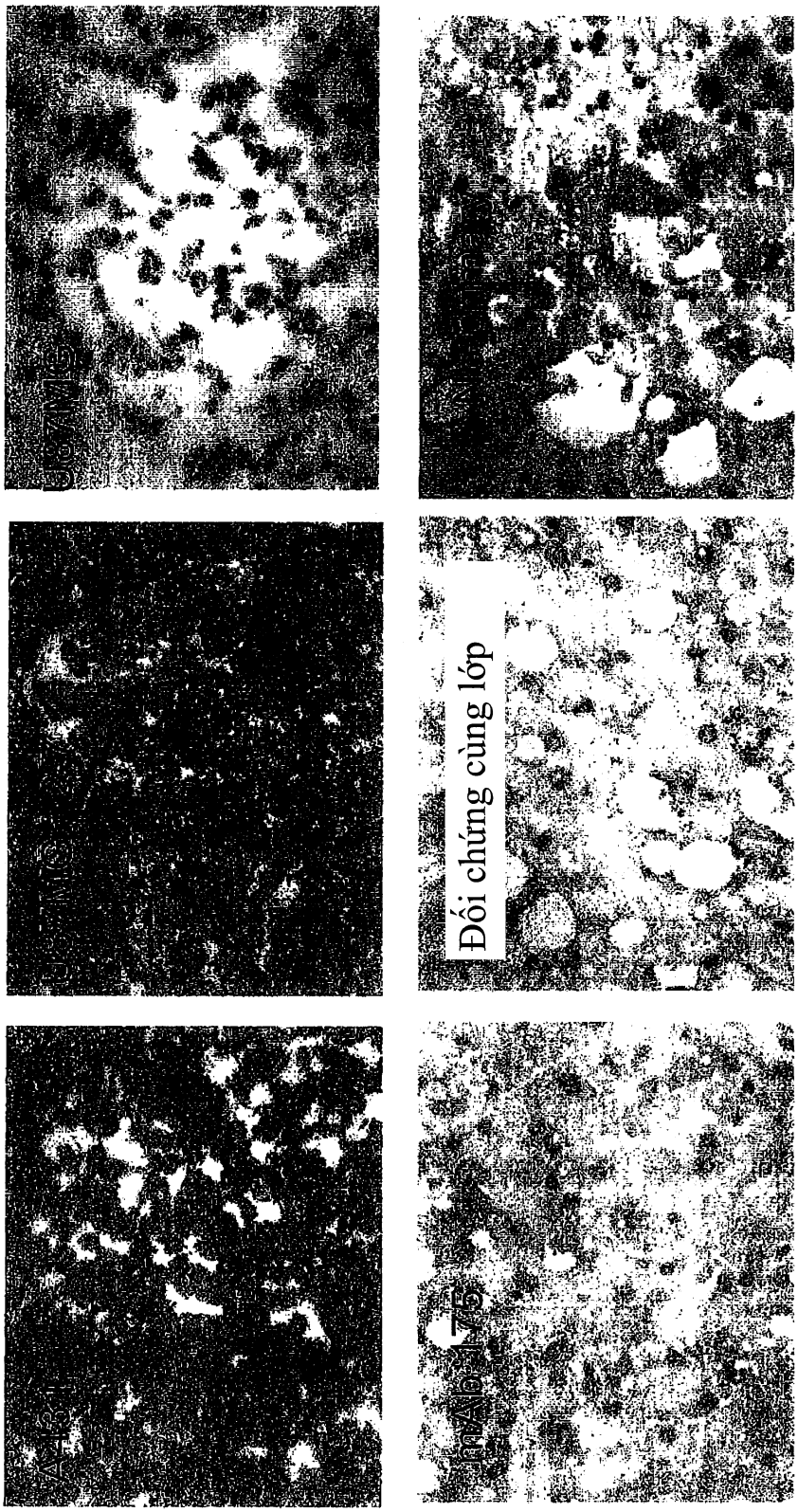


FIG.66A

FIG.66B

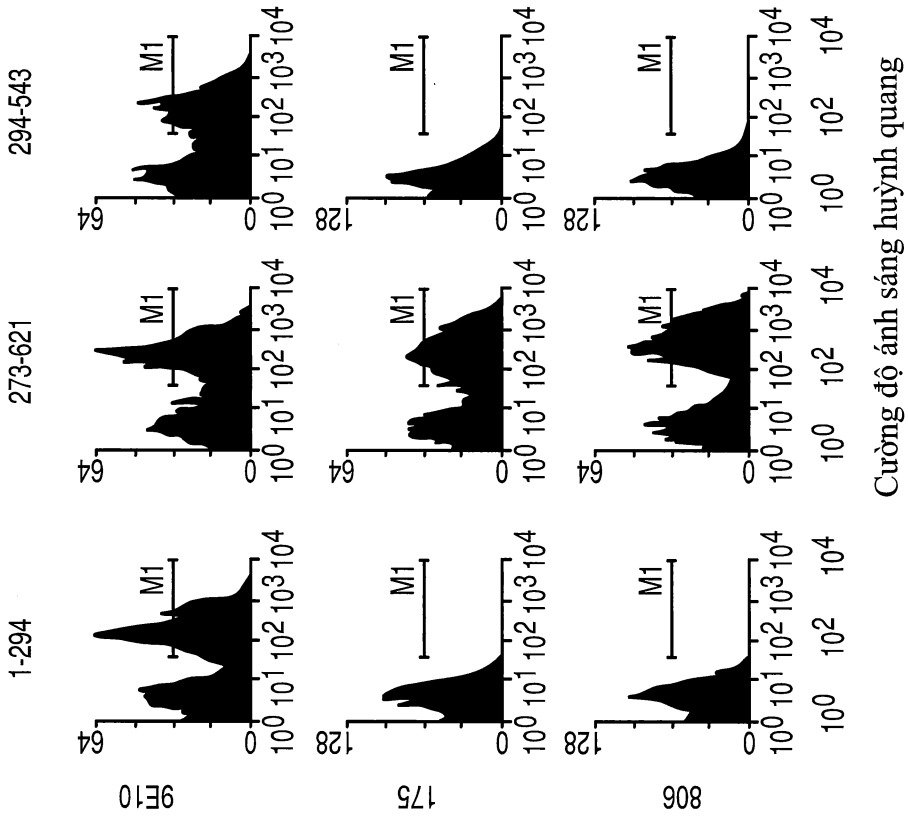


FIG. 67A

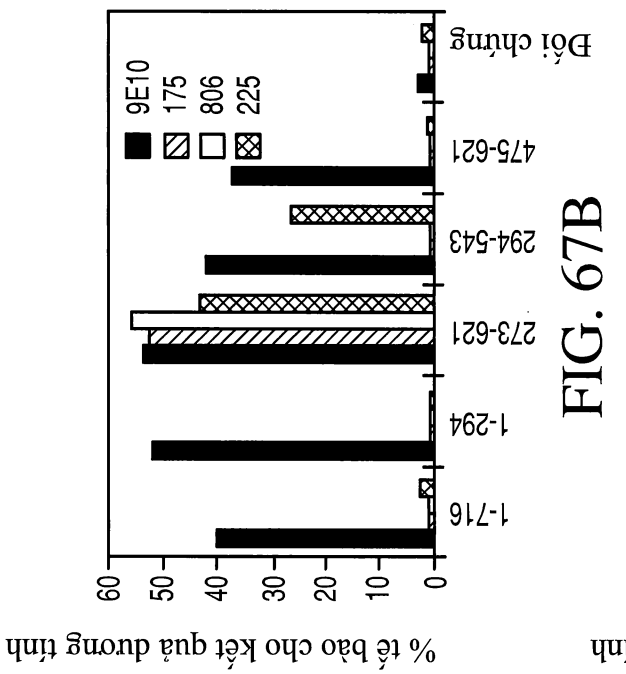


FIG. 67B

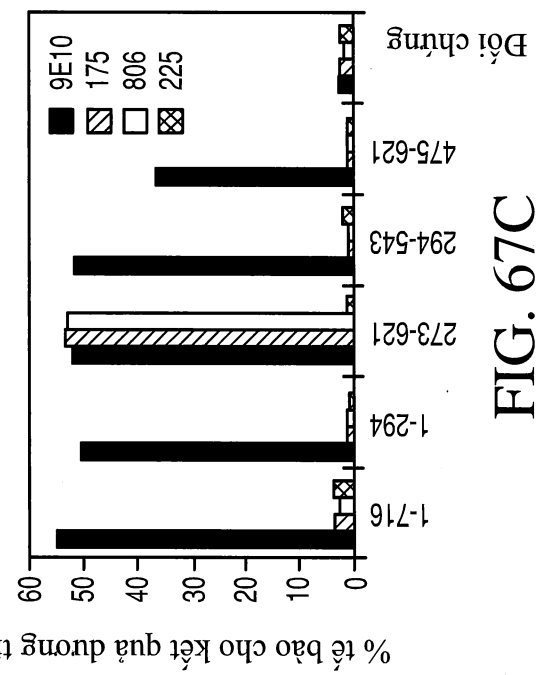


FIG. 67C

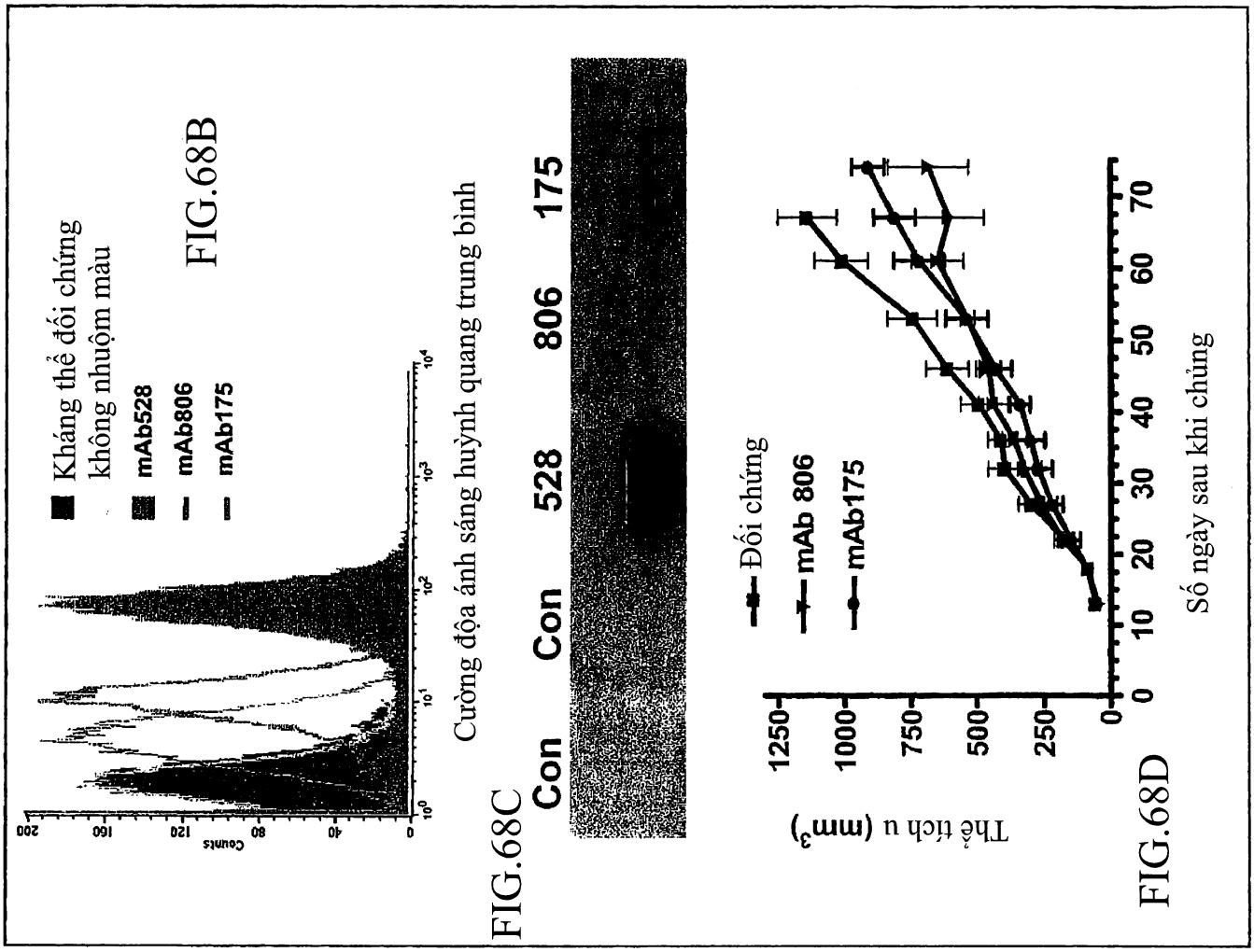


FIG.68B

FIG.68C

FIG.68D

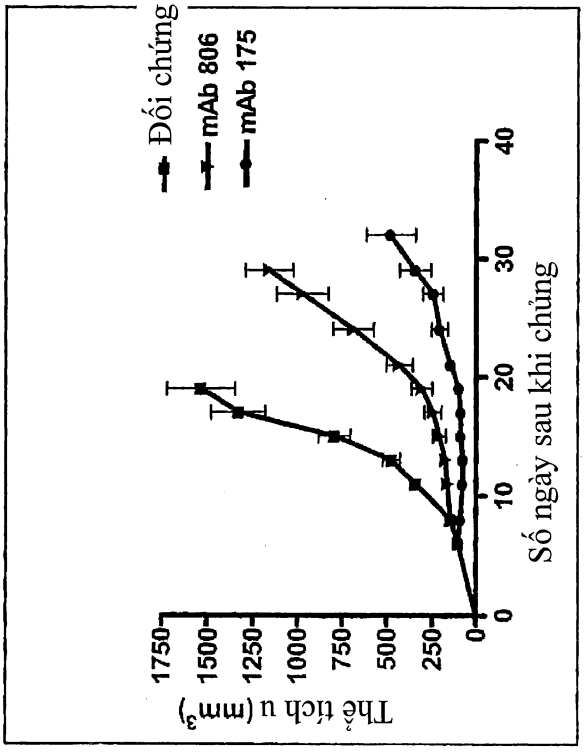


FIG.68A

FIG.69A

epitop của kháng thể 806

FIG.69B

epitop của kháng thể 175

FIG.69C

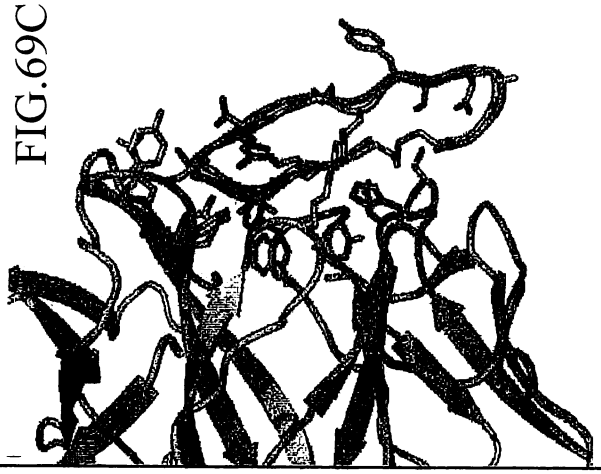


FIG.69D

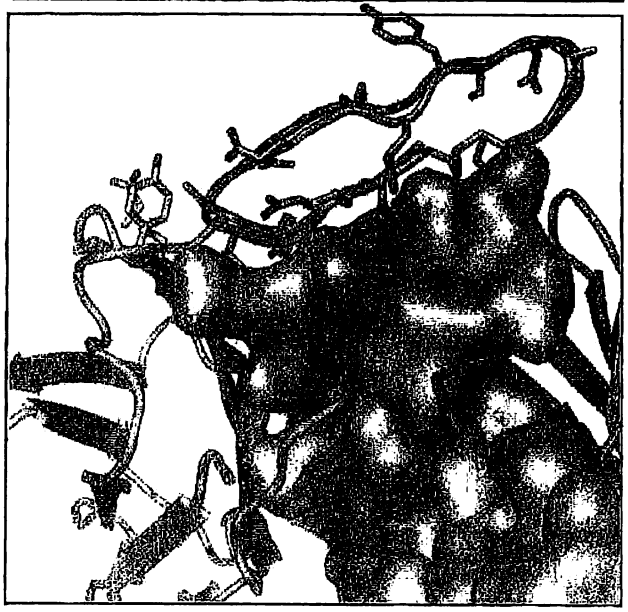
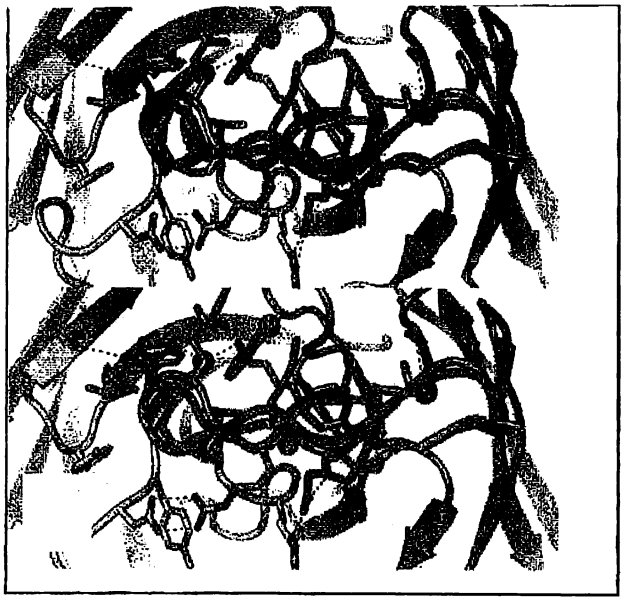


FIG.69E

FIG.69F



-440-

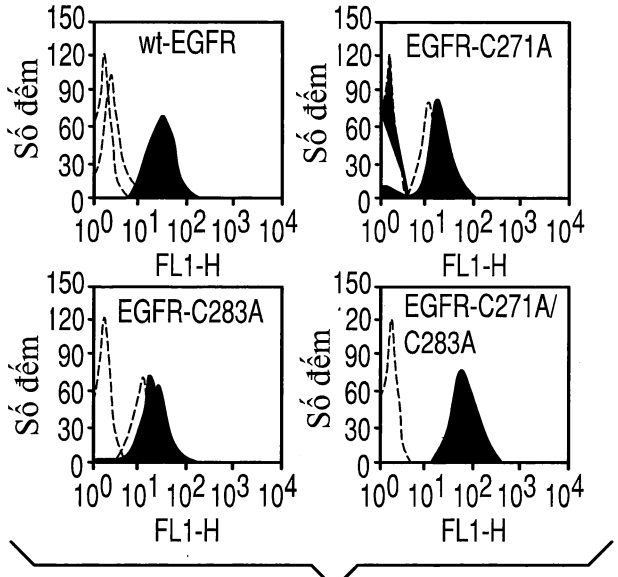


FIG. 70A

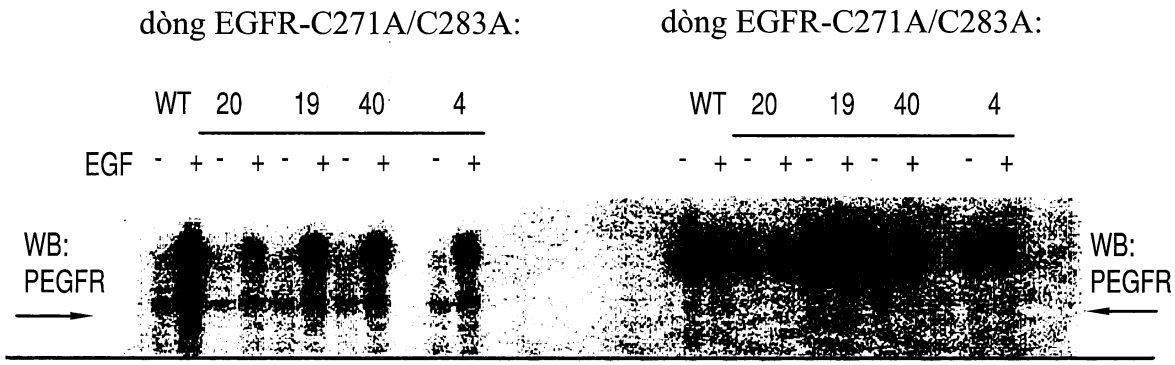
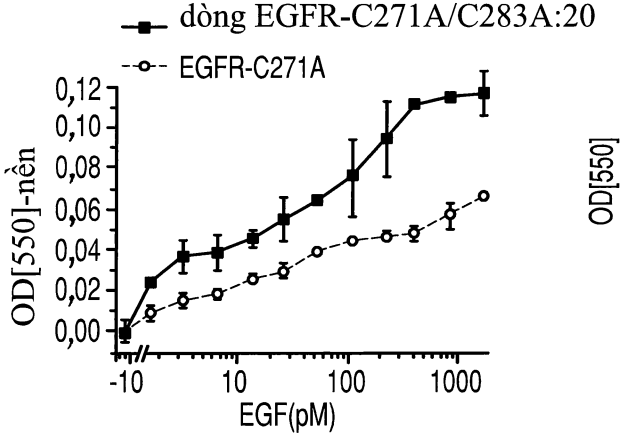
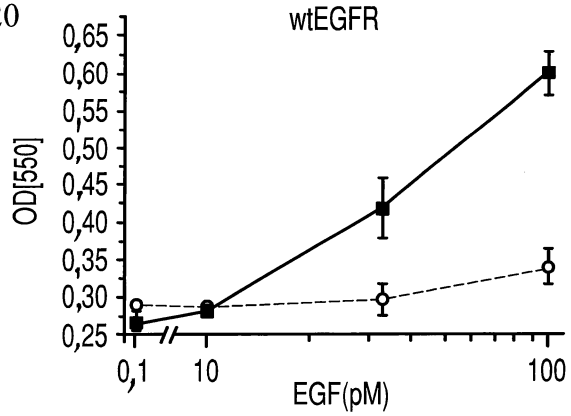


FIG. 70C

FIG. 70D

FIG. 70B





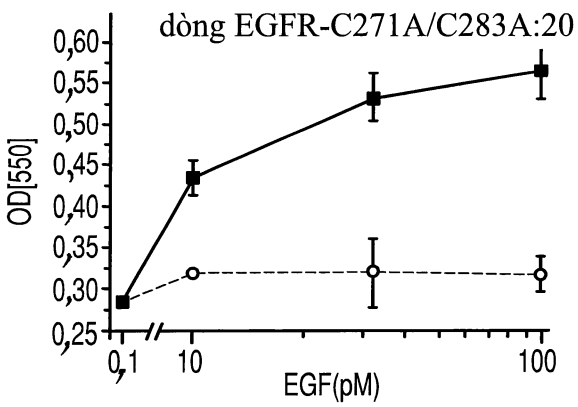


FIG.71A

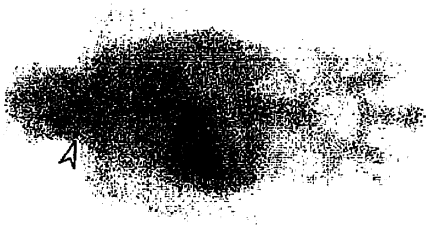


FIG.71B

FIG.71C

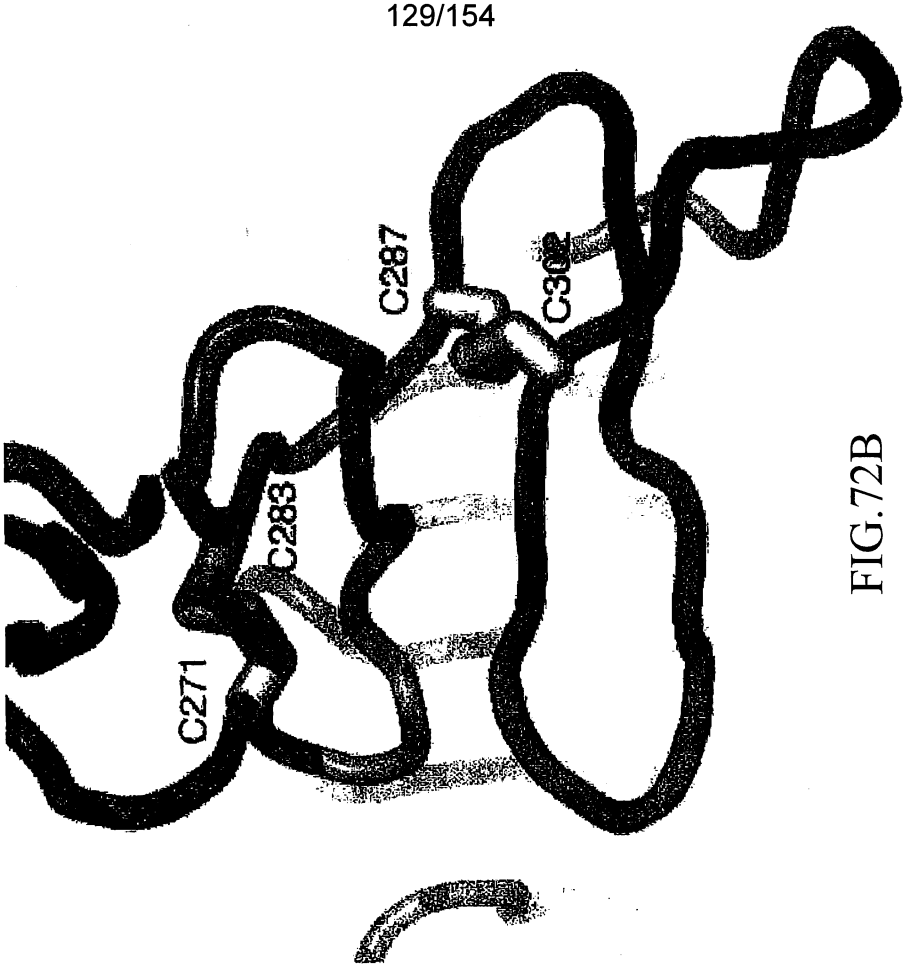


FIG.72B

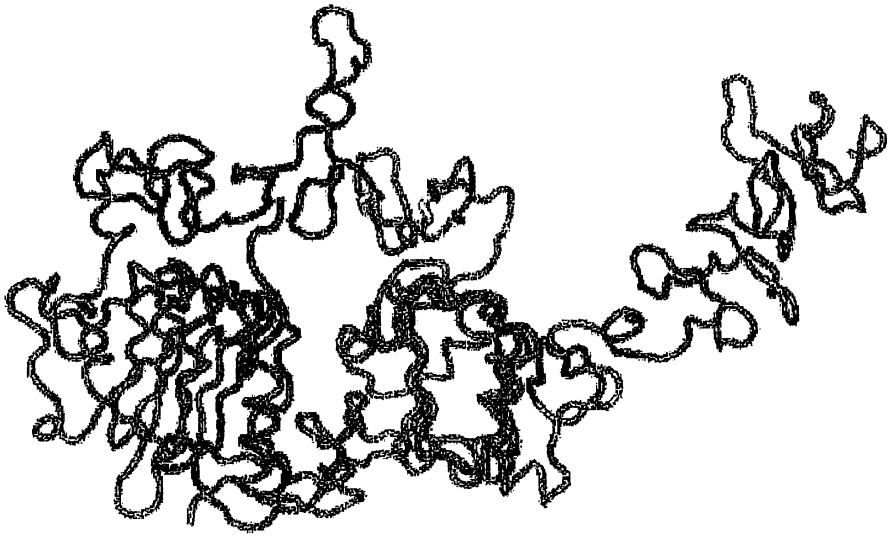


FIG.72A

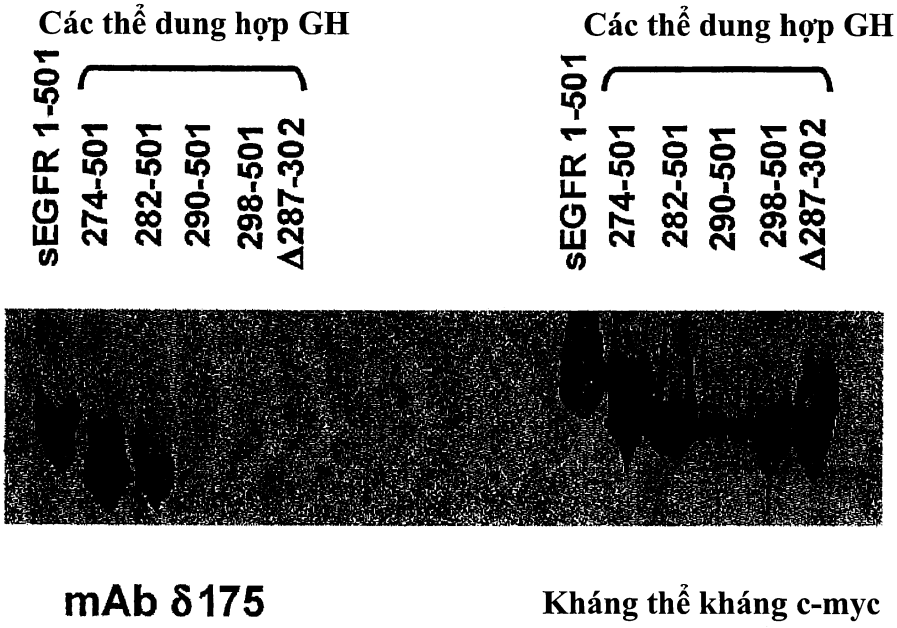

Các thể dung hợp GH
sEGFR 1-501
274-501
282-501
290-501
298-501
Δ287-302
Các thể dung hợp GH
sEGFR 1-501
274-501
282-501
290-501
298-501
Δ287-302
mAb δ175
Kháng thể kháng c-myc

FIG.73

Chuỗi VH của mAb175: Trình tự axit nucleic và axit amin

Trình tự axit nucleic

TTAGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTA
CTCAATCACCAGTGACTATGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
TTACAGTGCTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATTC
TTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTACT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCC (SEQ ID NO:128)

FIG.74A

Trình tự axit amin

LVKLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSANTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLN
CDR1 *CDR2*
SVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:129)
CDR3

FIG.72B

Chuỗi VL của mAb175: Trình tự axit nucleic và axit amin

Trình tự axit nucleic

GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTCTATCTCTGGGAGACACAGTCAGTATCACTTGCCATTCAAGTCA
GGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAA
CTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAA
TCTGAAGATTTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAA
TCAAACGG (SEQ ID NO:133)

FIG.75A

Trình tự axit amin

DIVLTQSPSSMSLSLGDTVSITCHSSQDISSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFVD
CDR1 *CDR2*
YYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:134)
CDR3

FIG.75B

Nồng độ sản phẩm tính theo thể tích và **B)** nồng độ tế bào sống sót của thể chuyển nhiễm hu806 GS-CHO (14D8, 15B2 và 40A10) và GS-NS0 (36) trong môi trường nuôi cấy trong bình lắc quy mô nhỏ. Nồng độ sản phẩm được ước tính bằng thử nghiệm ELISA sử dụng kháng thể kháng idiotýp 806 làm kháng thể phủ và ch806 lô lâm sàng: J06024 làm chuẩn

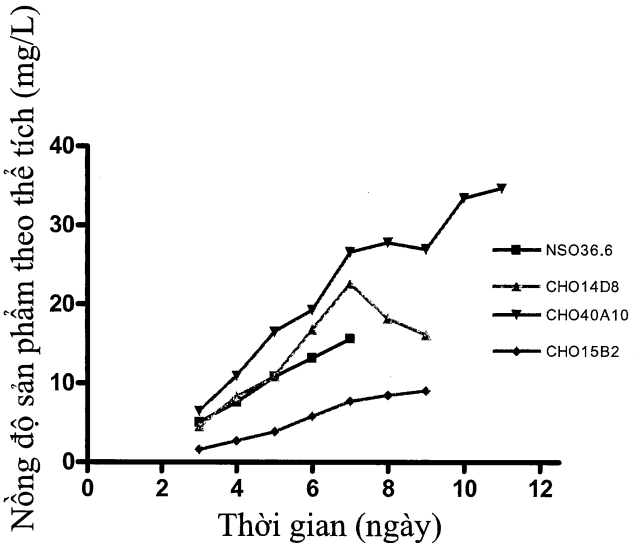


FIG.76A

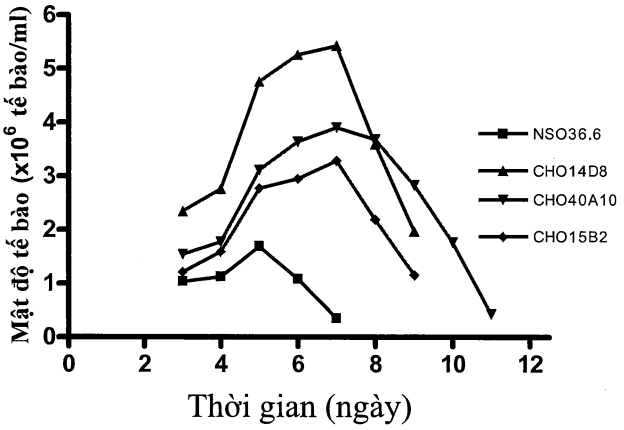


FIG.76B

Sự phát triển của tế bào chuyển nhiễm GS-CHO 40A10 và nồng độ sản phẩm theo thể tích trong thùng phản ứng sinh học có cánh khuấy dung tích 15L. mật độ tế bào sống sót (◆x 10^5 tế bào/ml khả năng sống sót của tế bào (■) và năng suất (▲mg/L)

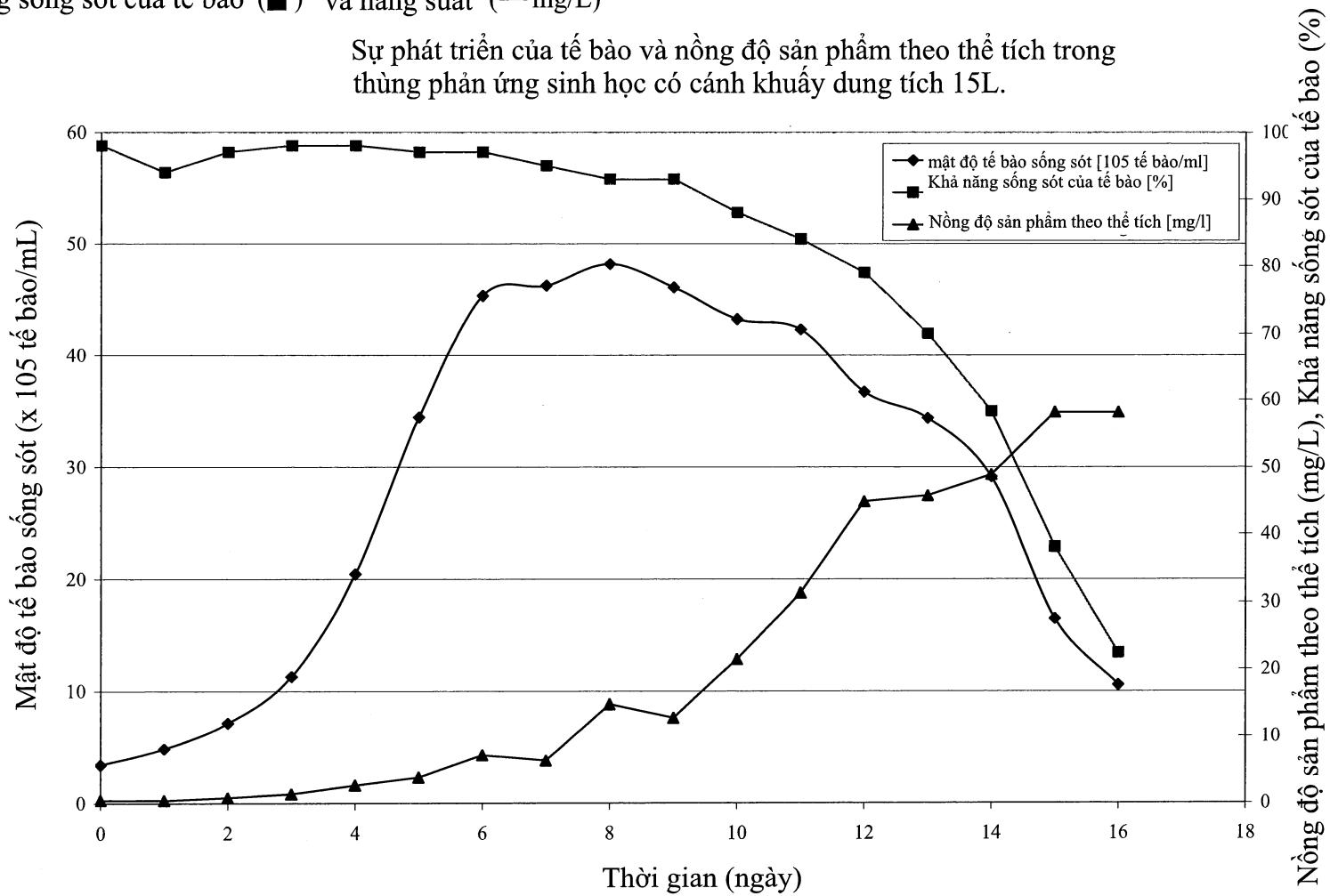


FIG.76C

Kết quả phân tích sắc ký loại theo kích thước (Biosep SEC-S3000) của các cấu trúc kháng thể hu806 được tinh chế trên Protein A được sản xuất trên môi trường nuôi cấy quy mô lớn và đối chứng ch806 và mAb806. Các sắc ký đồ ở bước sóng A214nm được thể hiện ở các bảng trên cùng và ở A280nm ở bảng dưới cùng của mỗi hình

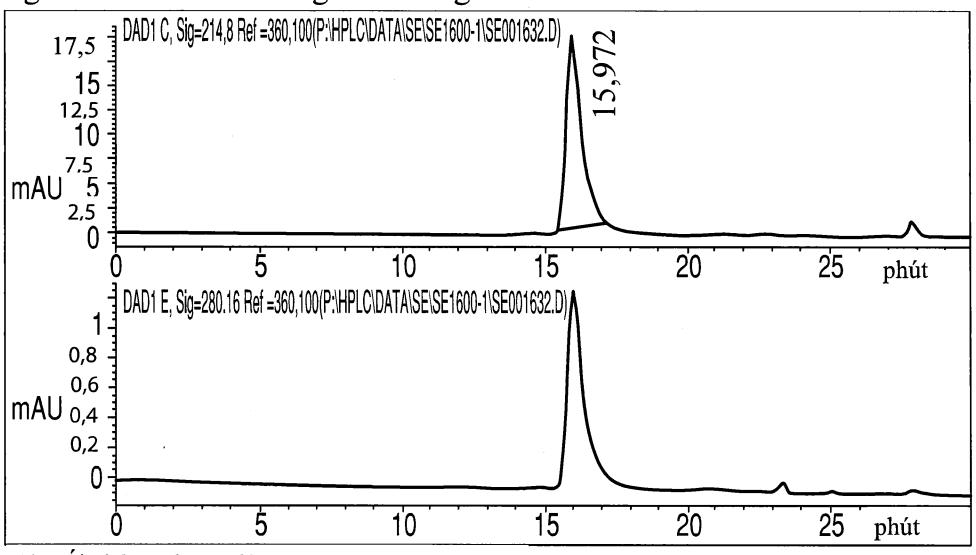


FIG. 77A

A) Đối chứng ch806, lô J06024

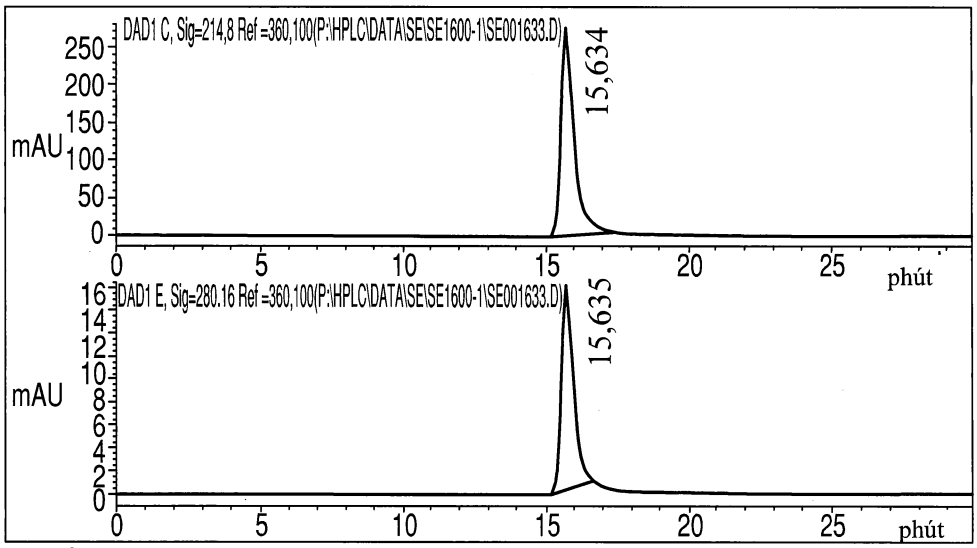


FIG. 77B

A) Đối chứng mAb806

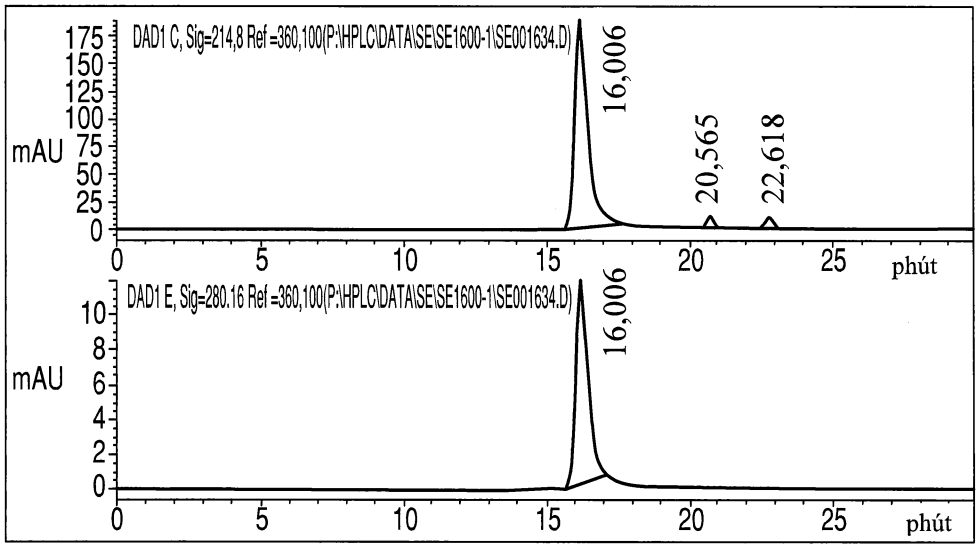
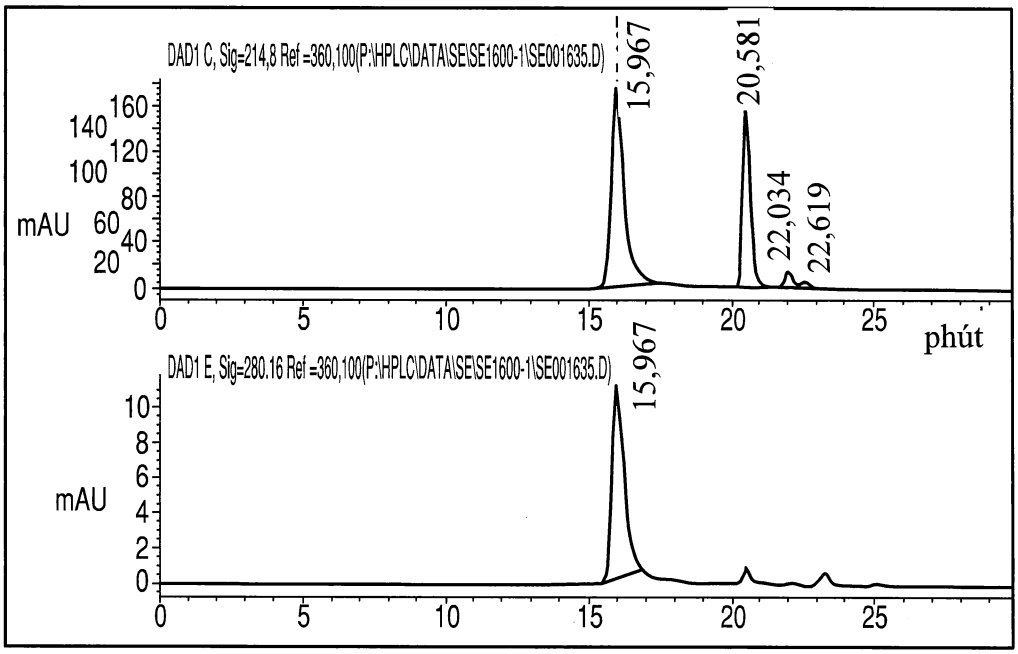


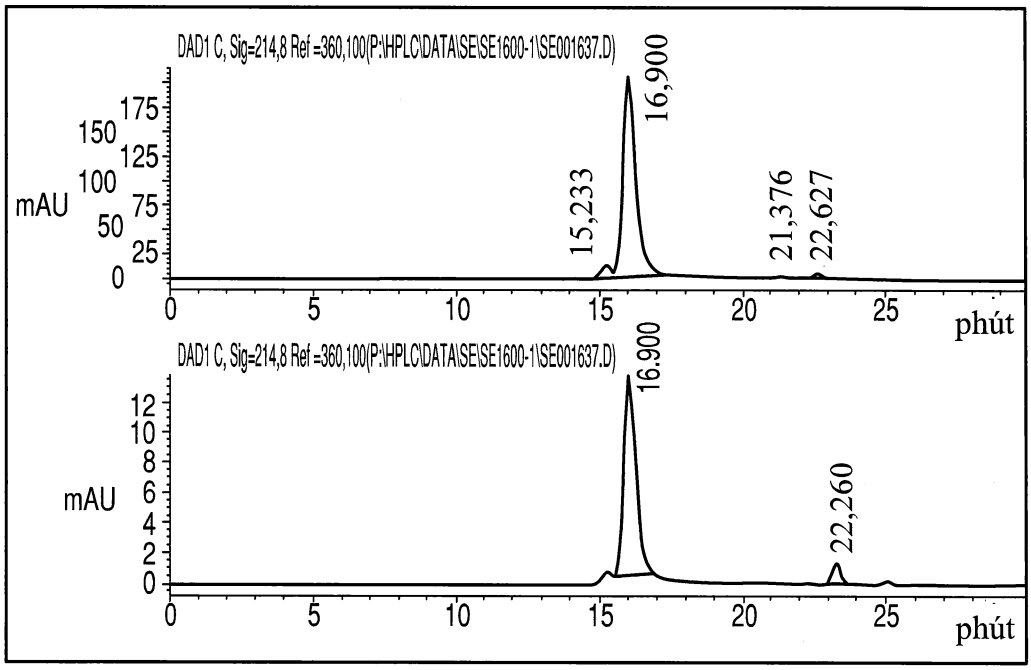
FIG. 77C

C) Sản phẩm chuyển nhiễm GS-CHO hu806 14D8 đã tinh chế



D) Sản phẩm chuyển nhiễm GS-CHO hu806 15B2 đã tinh chế

FIG. 77D



C) Sản phẩm chuyển nhiễm GS-CHO hu806 36 đã tinh chế

FIG. 77E

F
p
p
a

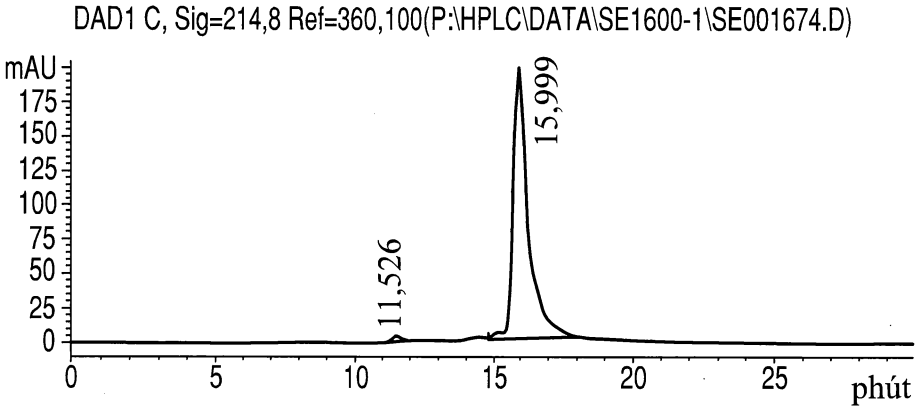

DAD1 C, Sig=214,8 Ref=360,100(P:\HPLC\DATA\SE1600-1\SE001674.D)
mAU
175
150
125
100
75
50
25
0
11,526
15,999
0
5
10
15
20
25
phút

FIG. 78

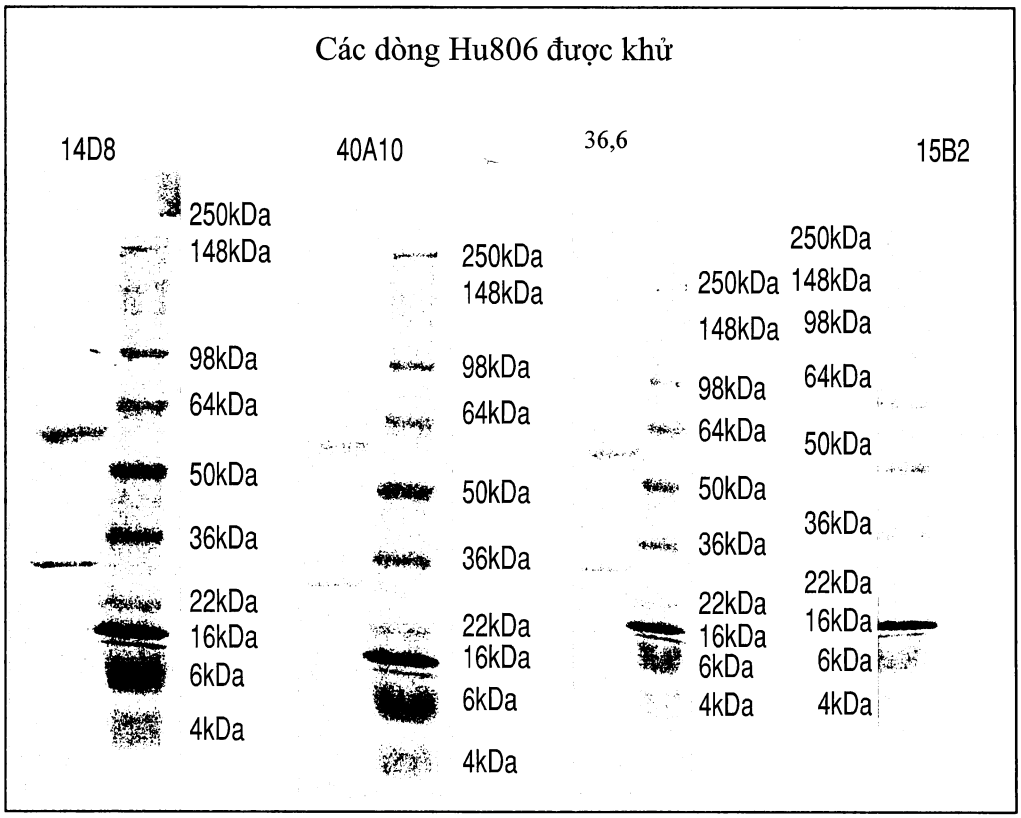

Các dòng Hu806 được khử
14D8
40A10
36,6
15B2
250kDa
148kDa
98kDa
64kDa
50kDa
36kDa
22kDa
16kDa
6kDa
4kDa

FIG. 79

Các dòng Hu806 không được khử

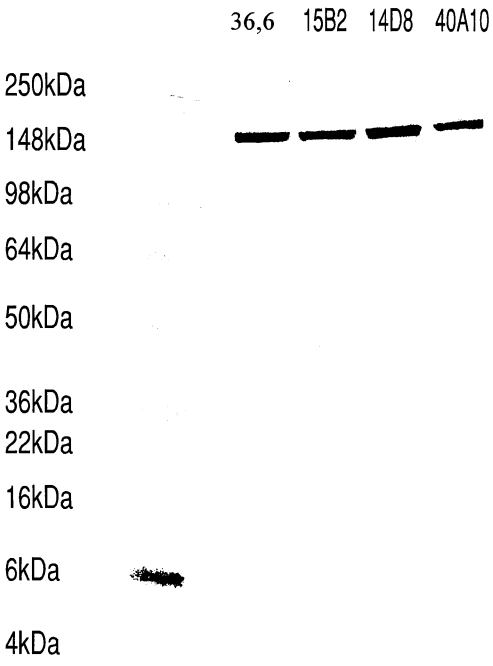


FIG. 80

Các gel 4-20% Tris/Glyxin đúc sẵn được sử dụng trong các điều kiện SDS-PAGE chuẩn để phân tích hu806 CHO 40A10 chuyển nhiễm đã tinh chế (5 microgam) sau khi sản xuất trên quy mô lớn. Các protein được phát hiện bằng màu nhuộm xanh Coomassie

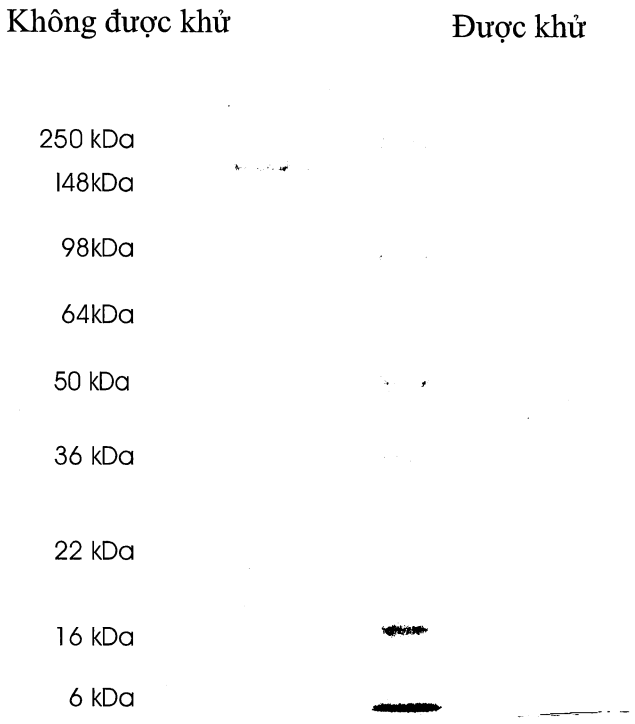


FIG.81

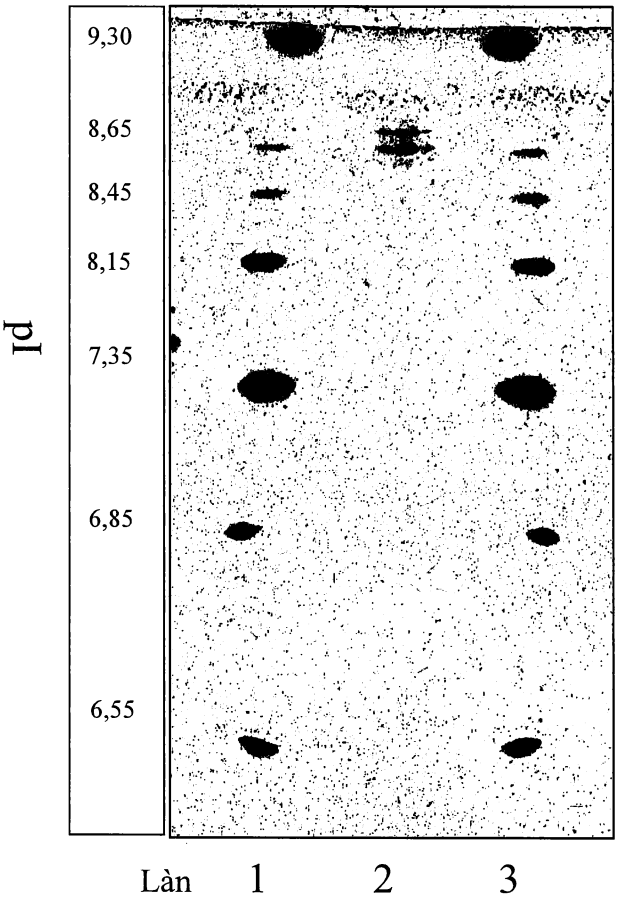


FIG.82

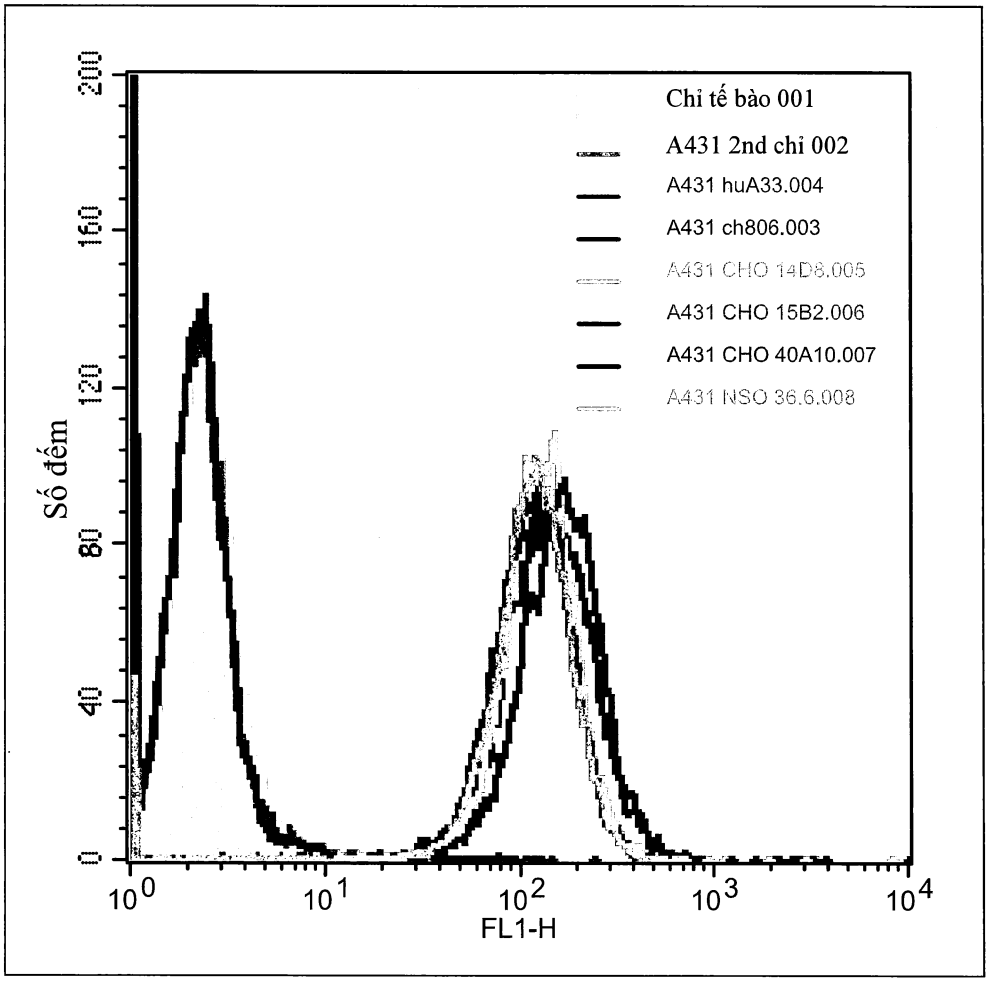
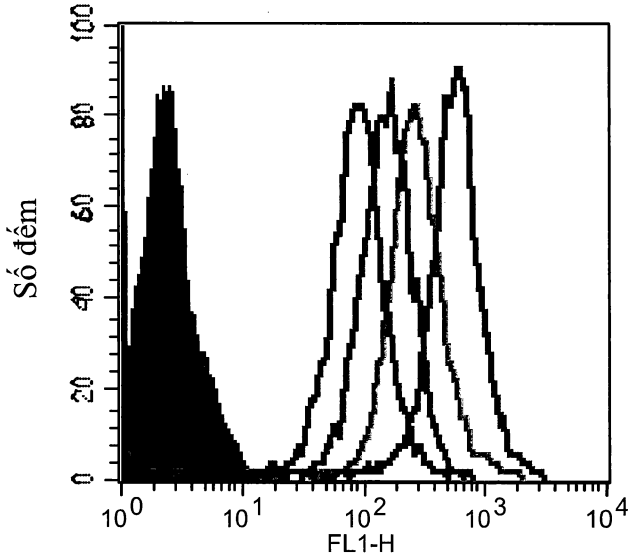

Chỉ tế bào 001
A431 2nd chỉ 002
A431 huA33.004
A431 ch806.003
A431 CHO 14D8.005
A431 CHO 15B2.006
A431 CHO 40A10.007
A431 NSO 36.6.008
Số đếm
0
40
80
120
160
200
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

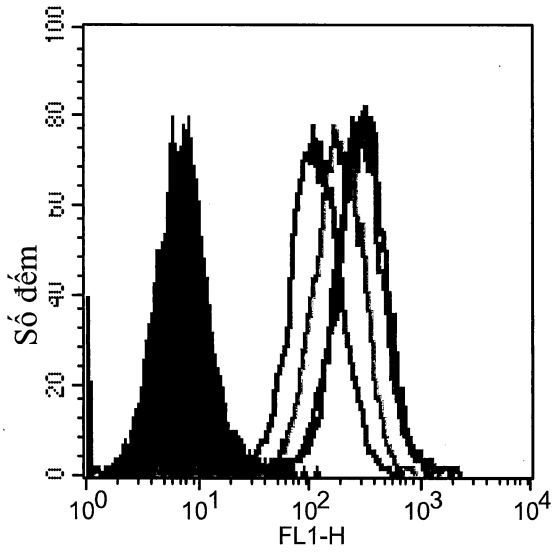
FIG.83



Chú thích	Tên	Thông số	Cổng
	A431 2B.003	FL1-H	Không cổng
	A431 m528.004	FL1-H	Không cổng
	A431 m806.005	FL1-H	Không cổng
	A431 ch806.006	FL1-H	Không cổng
	A431 Hu806.007	FL1-H	Không cổng

FIG.84

Liên kết với các tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7. Phân tích bằng cách đo dòng tế bào các chế phẩm chứa kháng thể mAb806, ch806 và hu806 40A10 (20microgam/ml) và kháng thể kháng EGFR 528 và kháng thể đối chứng không liên quan (20 microgam/ml)



Chú thích	Tên	Thông số	Cổng
	U87MG.d2-7 2B.009	FL1-H	Không cổng
	U87MG.d2-7 m528.011	FL1-H	Không cổng
	U87MG.d2-7 m806.012	FL1-H	Không cổng
	U87MG.d2-7 ch806.013	FL1-H	Không cổng
	U87MG.d2-7 Hu806.014	FL1-H	Không cổng

FIG.85

Liên kết đặc hiệu của các cấu trúc kháng thể 806 được đánh dấu phóng xạ bằng I-125 với: **A)** các tế bào u thần kinh đệm U87MG.de2-7 và **B)** các tế bào caxinoma A431

FIG.86

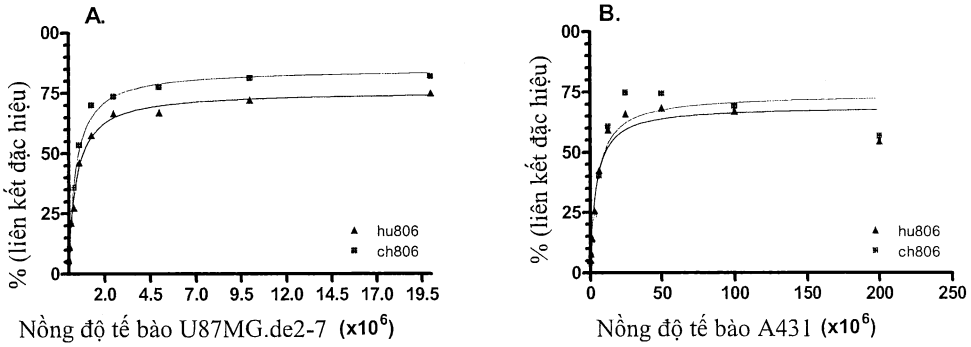


Fig.12: Phân tích Scatchard: các cấu trúc kháng thể A) ch806 và kháng thể hu806 được đánh dấu phóng xạ bằng I-125 với các tế bào U87MG.de2-7

FIG.87

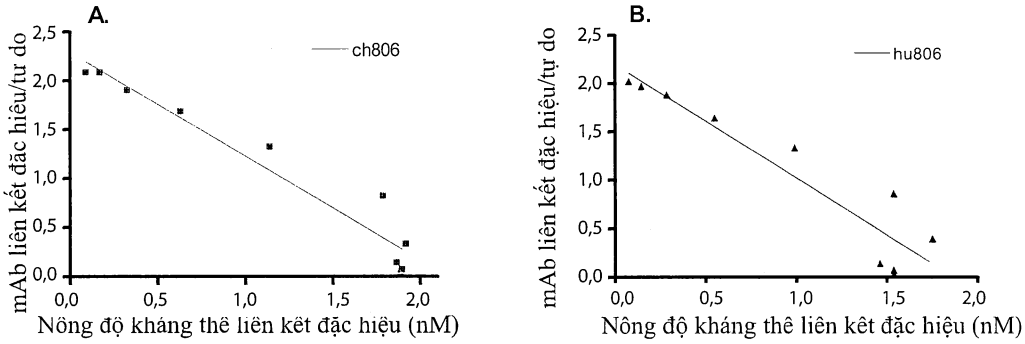
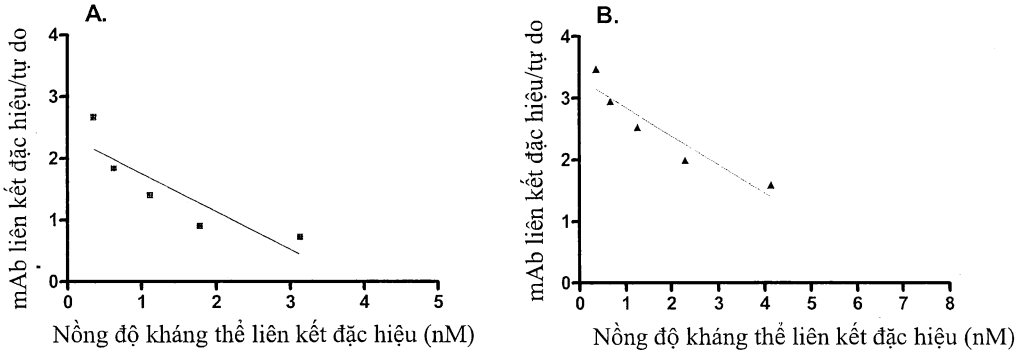


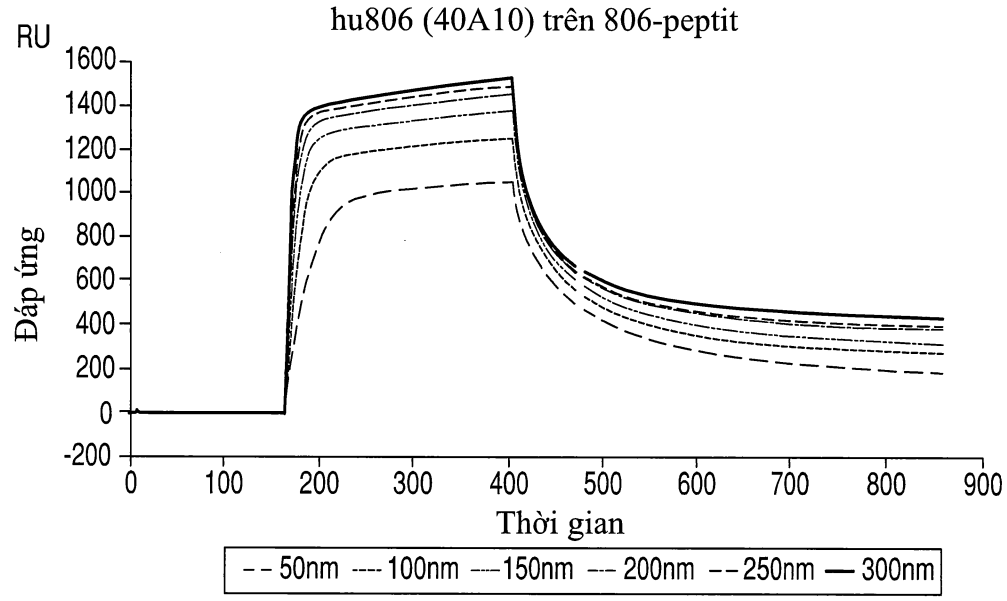
Fig.13: Phân tích Scatchard: các cấu trúc kháng thể A) ch806 và kháng thể hu806 được đánh dấu phóng xạ bằng I-125 với các tế bào A431

FIG.88



Phân tích BIAcore liên kết với epitop peptit của 287-302EGFR của **A)** hu806 và **B)** ch806 bỏ qua peptit được cố định với nồng độ tăng dần 50nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM and 300nM.

A.



B.

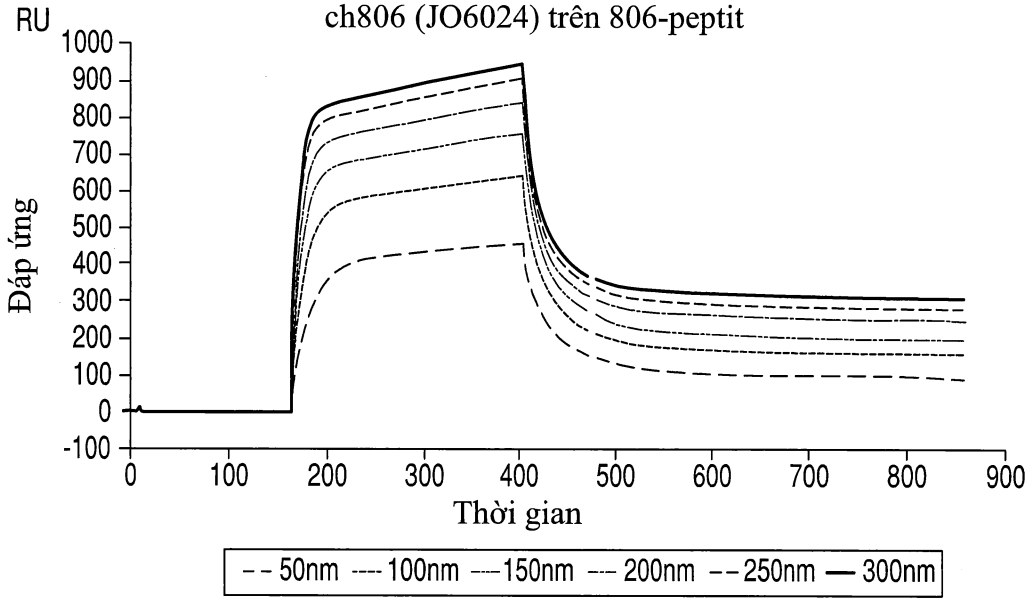


FIG. 89

Tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể qua trung gian ch806 và hu806 trên các tế bào đích A431 được xác định ở **A)** 1microgam/l mỗi kháng thể trên khoảng tỷ lệ tế bào tác động/tế bào đích (E:T = 0,78 đến 100:1) ở E:T = 50:1 trên khoảng nồng độ mỗi kháng thể (3,15 ng/ml - 10 microgam/ml) trên tế bào đích A431

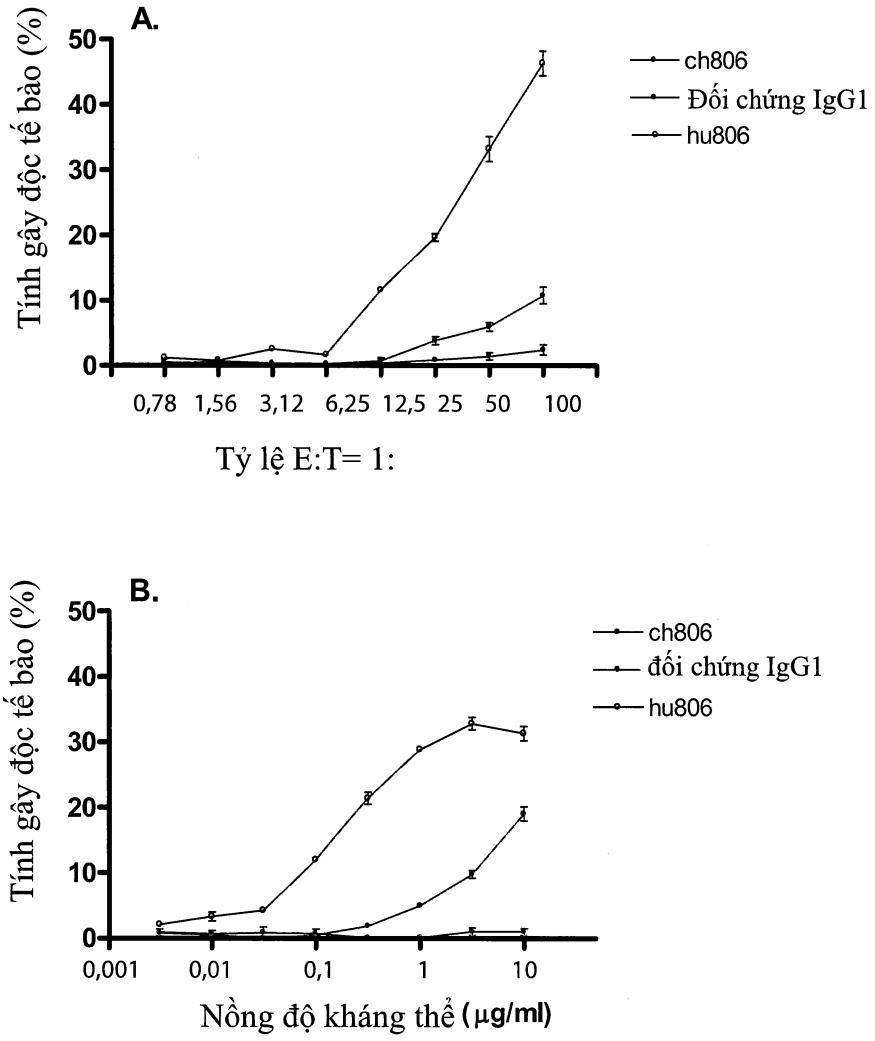


FIG.90

Fig.16: Điều trị các mảnh ghép u khác loài A431 đã tồn tại ở chuột nhắt trụi lông BALB/c. Các nhóm gồm 5 con được nhận 6 x liều mg trong hai tuần điều trị bằng kháng thể như được thể hiện (các mũi tên). Thể tích u được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho đến khi kết thúc thử nghiệm

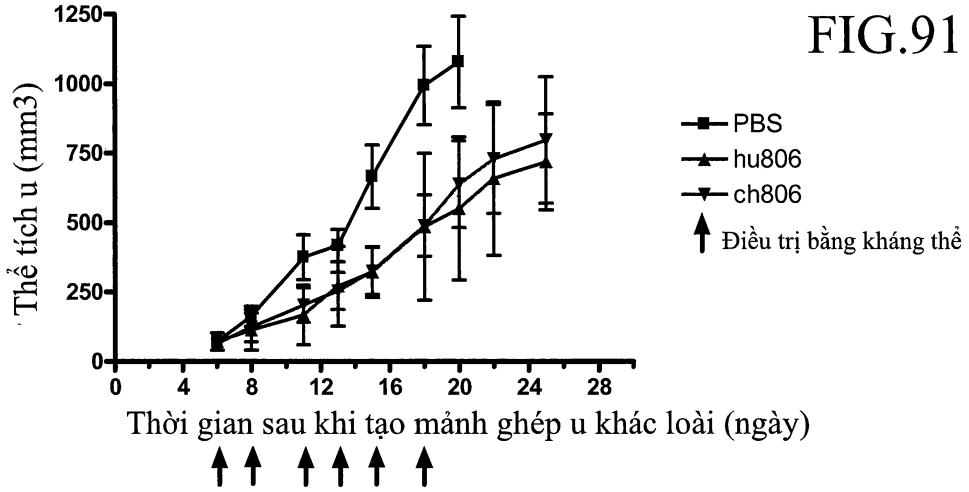


FIG.91

Fig.17: Điều trị các mảnh ghép u khác loài U87MG.de2-7 đã tồn tại ở chuột nhắt trụi lông BALB/c. Các nhóm gồm 5 con được nhận 6 x liều mg trong hai tuần điều trị bằng kháng thể như được thể hiện (các mũi tên). Thể tích u được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho đến khi kết thúc thử nghiệm

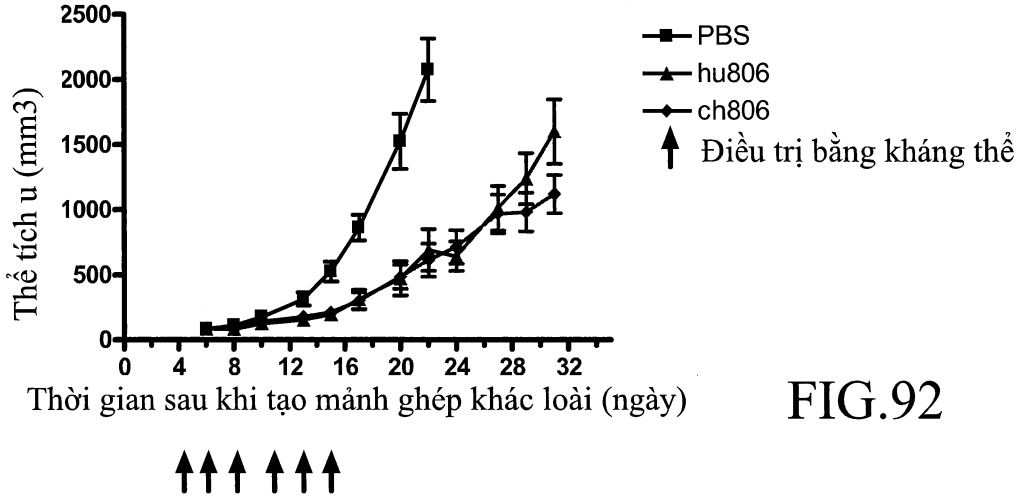


FIG.92

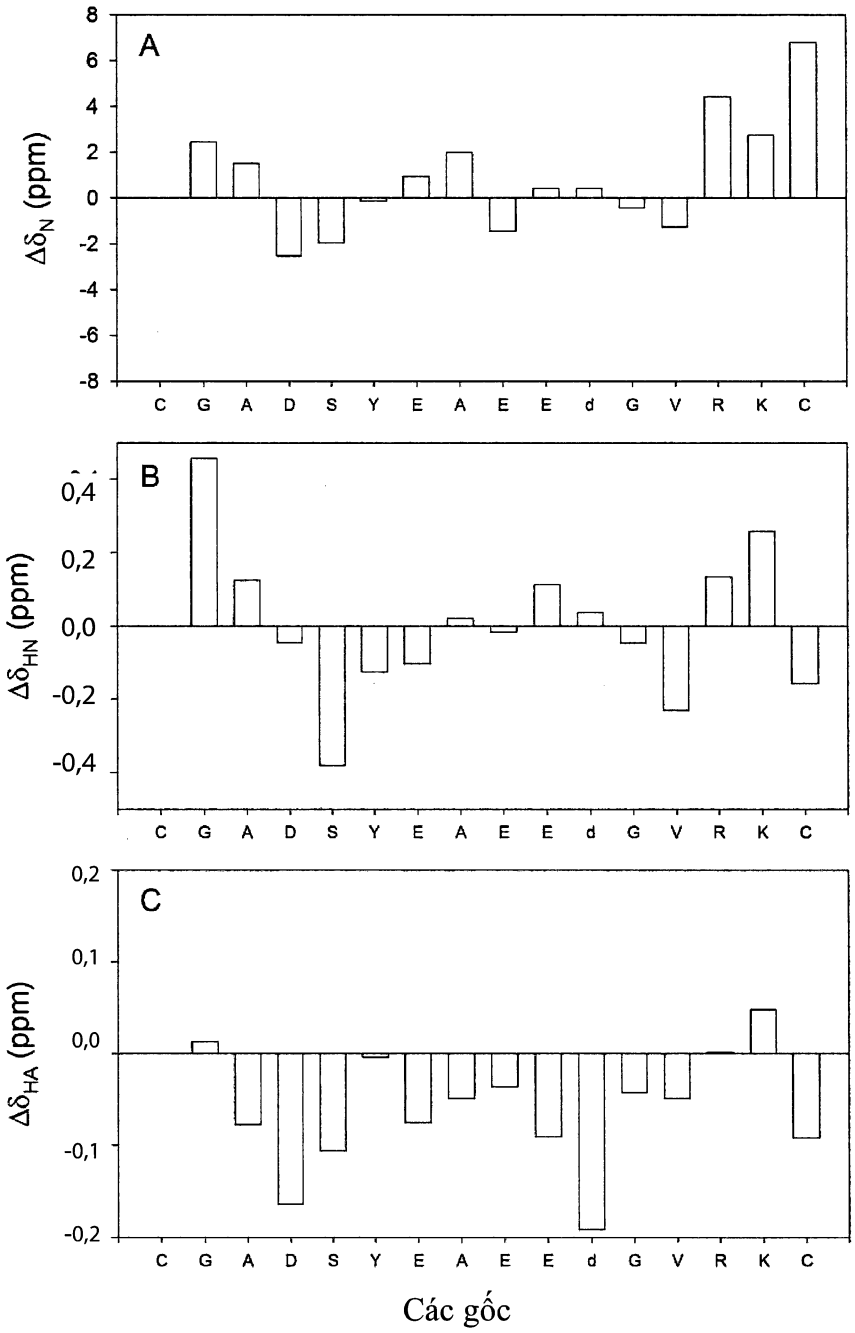

A
$\Delta\delta_N$ (ppm)
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
C G A D S Y E A E E d G V R K C
B
$\Delta\delta_{HN}$ (ppm)
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
C G A D S Y E A E E d G V R K C
C
$\Delta\delta_{HA}$ (ppm)
0,2
0,1
0,0
-0,1
-0,2
C G A D S Y E A E E d G V R K C
Các gốc

FIG.93

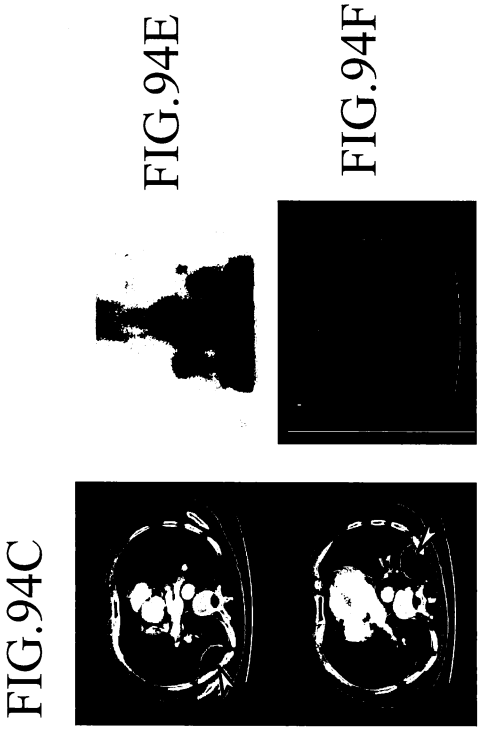


FIG.94A FIG94B FIG.94C FIG.94D FIG.94E FIG.94F

FIG.95A FIG.95B FIG.95C

FIG.95D FIG.95E FIG.95F

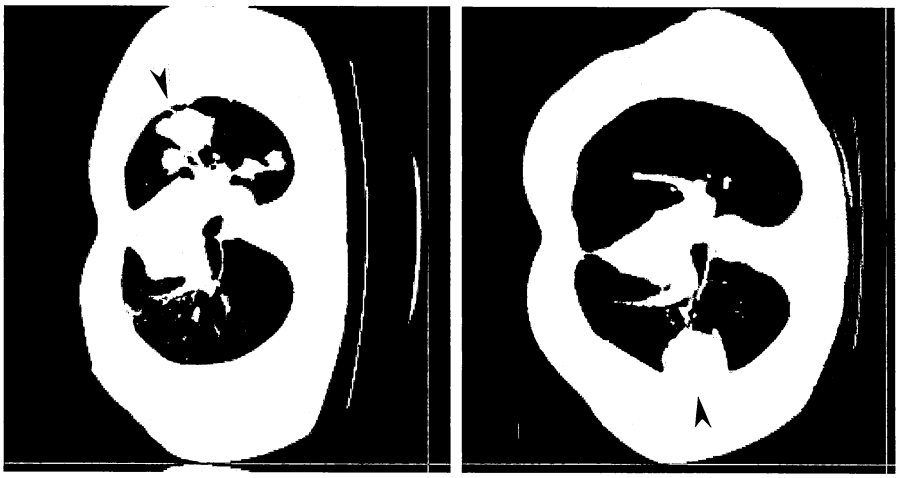


FIG.96B

FIG.96D

FIG.96A

FIG.96C

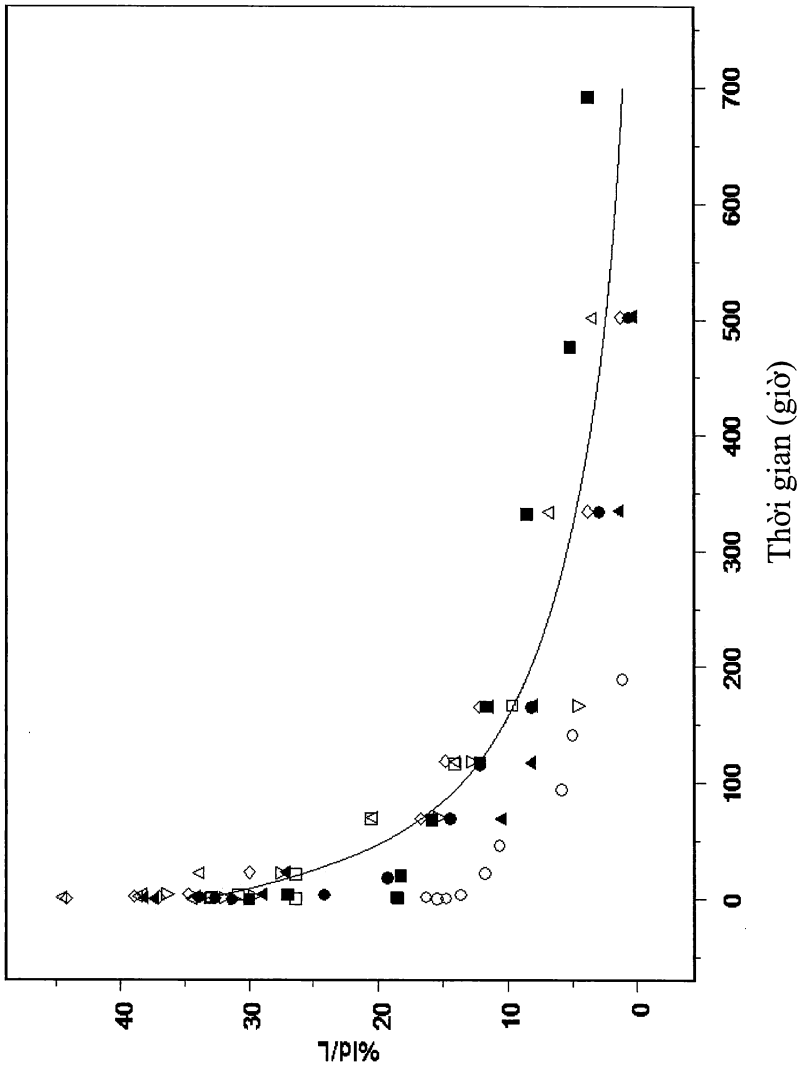


FIG.97

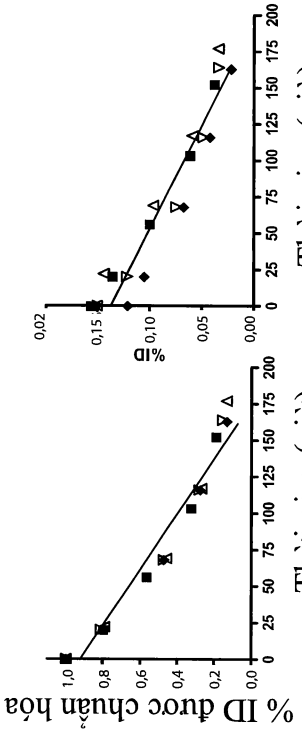


FIG.98A

FIG.98B