



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

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**

CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 

1-0019897

(51)⁷ **C07K 16/28, A61K 39/395**

(13) **B**

(21) 1-2013-01052

(22) 04.10.2011

(86) PCT/EP2011/067339 04.10.2011

(87) WO2012/045752 12.04.2012

(30) 10186468.4 04.10.2010 EP

(45) 25.10.2018 367

(43) 25.07.2013 304

(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

(72) KONOPITZKY, Renate (AT), BORGES, Eric (DE), ADAM, Paul (GB), HEIDER, Karl-Heinz (DE)

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) **TÁC NHÂN GẮN KẾT CD33 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA TÁC NHÂN GẮN KẾT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch trên cơ sở sự ức chế tế bào dạng tủy. Cụ thể, sáng chế đề cập đến tác nhân gắn kết CD33 sử dụng trong liệu pháp này, ví dụ trong điều trị khối u ác tính tế bào dạng tủy và hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome - MDS). Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch trên cơ sở sự ức chế tế bào dạng tủy. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến tác nhân gắn kết CD33 sử dụng trong các liệu pháp như vậy, chẳng hạn như trong điều trị các tế bào tủy ác tính và hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome - MDS). Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa tác nhân gắn kết này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong đầu những năm 1980, CD33 được xác định là một chỉ thị của bệnh bạch cầu tủy xương (Andrews et al., Blood 62, 24-132, 1983). CD33 là một kháng nguyên bề mặt biểu hiện đặc hiệu trên các tế bào tủy bao gồm các tế bào bệnh bạch cầu tủy xương. Nó là thành viên nhỏ nhất trong họ siglec (lectin liên quan đến globulin miễn dịch liên kết với axit sialic). CD33 được biểu hiện trên các tế bào gốc tạo máu đa dòng ở giai đoạn đầu và tế bào tiền thân tủy đơn nhân. Chúng không có mặt các tế bào gốc tạo máu toàn năng (Andrews et al., Journal of Experimental Medicine 169, 1721-1731, 1989). Chúng được điều hòa giảm biểu hiện trên các bạch cầu hạt trưởng thành nhưng được giữ lại trên đại thực bào, bạch cầu đơn nhân và tế bào tua (Andrews et al., Blood 62, 24-132, 1983). Ngoài các tế bào tủy đơn nhân, CD33 cũng được thấy là được biểu hiện trên các dưỡng bào của người và bạch cầu ưa bazơ trong máu (Valent et al., Blood 15; 73(7):1778-85, 1989). Các kháng thể đơn dòng được định hướng kháng lại CD33 được sử dụng trong chẩn đoán bệnh bạch cầu cũng như để trị liệu hướng đích và sự “làm sạch” *in vitro* tủy xương để cho quá trình cấy ghép tự thân trong bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính (acute myeloid leukemia - AML) (Duzkale et al., Biol Blood Marrow Transplant. 9(6):364-72, 2003). Các nỗ lực ban đầu trong trị liệu hướng đích tập trung vào sự phát triển của độc tố miễn dịch mà sử dụng kháng thể kháng CD33 được tiếp hợp với độc tố rixin. Do CD33 nội nhập nhanh nhờ vào liên kết của kháng thể (Audran et al., J Immunol Methods. 188(1):147-54, 1995) nên phương pháp tiếp cận đối với độc tố miễn dịch là rất dễ dàng.

CD33 là glycoprotein xuyên màng có kích thước 67kD. Miền ngoại bào liên kết axit sialic của CD33 có liên quan đến sự kết dính tế bào-tế bào. Motif ức chế trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch nội bào (intracellular immunoreceptor tyrosine-based

inhibitory motif-ITIM) truyền các tín hiệu ức chế cho tế bào, ảnh hưởng đến sự tăng sinh và sự sống sót của tế bào. Con đường truyền tín hiệu thực tế của CD33 chưa được hiểu rõ ràng nhưng được giả thuyết rằng gồm các motif tương tự ITIM và ITIM và sự kéo theo tyrosin phosphatase (von Gunten et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1143: 61–82, 2008). Trình tự đồng nhất CD33 ở chuột cũng đã được xác định, nhưng so sánh khả năng về hoạt động chức năng với CD33 ở người thì vẫn bị nghi ngờ (Brinkman-Van der Linden et al., Mol Cell Biol., 23(12): 4199-206, 2003). Vai trò chức năng của CD33 ở người trên các bạch cầu bình thường và ác tính vẫn còn chưa được biết đến.

Một vài công bố đã mô tả CD33 như là chất chỉ thị bền vững trên bề mặt tế bào ở các tế bào AML và CML sơ cấp được biểu hiện ở từ 70 đến 100% người bệnh được thử nghiệm (Plesa et al., Cancer 112(3), 572-80, 2007; Hauswirt et al., Eur J Clin Invest. Jan 73-82, 2007; Scheinberg et al., Leukemia Vol. 3, 440-445, 1989). CD33 được biểu hiện trên các dưỡng bào tủy xương ác tính, có mặt trong phần lớn các tế bào ác tính trong máu ngoại vi và tủy xương của các bệnh nhân bị bệnh bạch cầu, và trên các tế bào gốc bạch cầu, lượng tương đối nhỏ các tế bào được biệt hóa ít hơn trong tủy xương được đặc trưng bởi khả năng tự tái sinh và duy trì sự phân hóa thứ bậc của dòng tế bào bạch cầu ác tính. Sự suy yếu các tế bào gốc bạch cầu ác tính có liên quan đến cơ chế chính của sự sống sót không còn khối u. CD33 hướng đích Mylotarg[®] có độc tố miễn dịch, kháng thể IgG₄ được làm giống như của người được tiếp hợp với độc tố chaliceamixin được sử dụng để điều trị cho người bệnh AML bằng cách phân phối lượng độc tố đến các tế bào AML dương tính CD33 (Amadori et al., Cancer Treat Rev. 34(1):49-60, 2008). Lintuzumab (SGN-33, HuM195), một kháng thể đơn dòng được làm giống như của người đặc hiệu CD33 “trần” được đánh giá trong thử nghiệm lâm sàng pha II để điều trị AML và MDS với các dấu hiệu lâm sàng ban đầu cho thấy hiệu quả từ nghiên cứu liều tăng dần của pha I và các trường hợp dung nạp ngược đã được báo cáo (Raza et al. Abstract #983, 14th EHA Congress, June 4-7, 2009).

Dòng tế bào AML hướng đích với HuM195 đặc hiệu CD33 *in vitro* làm giảm TNF- α gây ra sự tiết các cytokin gây viêm giống IL-8, MCP-1 và RANTES (Sutherland et al., Mabs 1:5, 481-490, 2009). Sự tương quan giữa tác dụng này với liệu pháp AML chưa được biết nhưng sự điều biến môi trường cytokin của vi môi trường khối u có thể góp phần vào hiệu quả trị liệu của kháng thể. Ngoài ra, kháng thể còn gây ra phản ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) và sự thực bào bởi tế bào phụ thuộc kháng thể

(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP) hoặc dòng tế bào AML *in vitro* (Sutherland et al., Mabs 1:5, 481-490, 2009). ADCC được xem là cơ chế quyết định hoạt tính kháng khối u của kháng thể trong các khối u ác tính huyết học. Dữ liệu từ các thử nghiệm lâm sàng với kháng thể Rituximab đơn dòng đặc hiệu CD20 chứng minh được tầm quan trọng của các cơ chế trung gian qua tế bào đáp ứng lại kích thích (tế bào “effector”) để điều trị các khối u ác tính tế bào B đối với đáp ứng trong quá trình điều trị bằng kháng thể (Weng and Levy, J Clin Oncol. 21 (21): 3940-7, 2003).

Tóm lại, rõ ràng rằng kháng nguyên CD33 được biểu hiện trên các tế bào bình thường của dòng tế bào tủy đơn nhân và biểu hiện thường xuyên trên tế bào khối u ở bệnh bạch cầu tủy xương. Trong thử nghiệm pha I với kháng thể đối kháng CD33 (lintuzumab) các dấu hiệu đầu tiên của sự hiệu quả được quan sát mà không có các tác dụng phụ nghiêm trọng nào. Tuy nhiên, sự triển khai lâm sàng của lintuzumab bị gián đoạn sau khi các kết quả từ thử nghiệm pha II kết hợp với hóa học trị liệu không thu được sự cải thiện mong muốn về hiệu quả. Do đó, có nhu cầu rõ ràng đối với sự phát triển các phương thức điều trị hướng đích CD33 cải thiện.

Theo quan điểm của tình trạng kỹ thuật, có nhu cầu trong việc cung cấp liệu pháp cải thiện hơn nữa đối với khối u ác tính tế bào tủy và MDS, đặc biệt là bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính.

Đặc biệt, có nhu cầu để cung cấp các tác nhân gắn kết đối kháng được cải thiện hơn nữa với CD33 để điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là AML.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất tác nhân gắn kết CD33 mới với CD33 ở người và được xác định bởi

a) có vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR4, CDR5 và CDR6, trong đó CDR1 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1-14, CDR2 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:14-28, CDR3 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 29-42, CDR4 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 43-56, CDR5 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 57-70, CDR6 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 71-84, hoặc

b) nhận diện epitop trong đó trình tự axit amin FFHPIPYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO: 141) của CD33 ở người.

Sáng chế còn đề xuất tác nhân gắn kết CD33 trong đó động học nội nhập của tác

nhân gắn kết CD33 là ít nhất 30%, tốt hơn là 40%, lượng kháng thể ban đầu còn lại trên bề mặt tế bào của các tế bào HL60 tại thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

Sáng chế còn đề xuất tác nhân gắn kết CD33, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 85-98 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 99-112.

Sáng chế còn đề xuất tác nhân gắn kết CD33, trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 113-126 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 127-140.

Sáng chế còn đề xuất tác nhân gắn kết CD33 có các đột biến trong vùng Fc làm tăng ADCC.

Các phương án được ưu tiên khác được nêu trong phần mô tả dưới đây và trong các điểm yêu cầu bảo hộ.

Tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế này được xác định có ái lực cao với CD33 ở người và còn có động học nội nhập có lợi, được đặc trưng bởi sự có mặt trong thời gian dài của các tác nhân gắn kết CD33 được liên kết với CD33 trên bề mặt của tế bào đích, chuyển thành hoạt tính ADCC có lợi.

Các tác giả nhận thấy rằng tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế liên kết với epitop khác nhau trong vùng ngoại bào của CD33 được so sánh với Lintuzumab. Không có sự ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết đặc biệt nào được cho là nguyên nhân của sự khác nhau của động học nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 và Lintuzumab theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig. từ Fig.1 đến Fig.3 mô tả sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 minh họa theo sáng chế khi so sánh với các tế bào lintuzumab trên HL60.

Fig. 4 mô tả tốc độ nội nhập trên các tế bào HL60 của hai kháng thể minh họa theo sáng chế khi so sánh với lintuzumab.

Fig. 5 mô tả hiệu suất của ADCC trên các tế bào HL60 của hai kháng thể minh họa theo sáng chế khi so sánh với lintuzumab.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tác nhân gắn kết CD33

Thuật ngữ "tác nhân gắn kết" được sử dụng ở đây có nghĩa là protein hoặc peptit liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Tác nhân gắn kết có thể, ví dụ, là kháng thể, dẫn xuất của kháng thể này, hoặc chất khác liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích.

Tác nhân gắn kết cũng có thể là protein bao gồm vùng Fv hoặc một phần của nó (ví dụ, V_H hoặc V_L hoặc (các) CDR của kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích). Theo một phương án được ưu tiên trong bản mô tả tác nhân gắn kết là kháng thể.

Thuật ngữ "tác nhân gắn kết CD33" được sử dụng ở đây dùng để chỉ tác nhân gắn kết liên kết đặc hiệu với CD33, thường là một phần của vùng ngoại bào của CD33 ở người.

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng ở đây dùng để chỉ (a) polypeptit globulin miễn dịch và các phần hoạt hóa miễn dịch của polypeptit globulin miễn dịch (tức là, polypeptit của họ globulin miễn dịch, hoặc mảnh của nó, mà chứa vị trí liên kết gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên đích đặc hiệu), hoặc (b) dẫn xuất được thể bảo tồn của polypeptit globulin miễn dịch này hoặc đoạn liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên đích. Kháng thể thường được mô tả, ví dụ, trong Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ các kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đặc hiệu đơn, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và đoạn kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (ví dụ, liên kết kháng nguyên). Kháng thể có thể thuộc loại hoặc lớp bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, và IgA) hoặc lớp phụ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2), tốt hơn là trong lớp IgG, tốt hơn nữa là IgG1.

Kháng thể "nguyên vẹn" là một kháng thể bao gồm vùng biến đổi liên kết kháng nguyên cũng như vùng cố định chuỗi nhẹ và vùng cố định chuỗi nặng cho thích hợp với lớp kháng thể. Vùng cố định có thể là vùng cố định có trình tự nguyên gốc (ví dụ, vùng cố định có trình tự nguyên gốc ở người) hoặc biến thể trình tự axit amin của chúng.

"Mảnh kháng thể" bao gồm một phần kháng thể, gồm vùng biến đổi hoặc liên kết kháng nguyên hoặc một phần của chúng. Ví dụ về mảnh kháng thể gồm đoạn Fab, Fab', $F(ab')_2$, và Fv, mảnh liên kết kháng nguyên V_H và V_L , kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp, kháng thể đặc hiệu ba tái tổ hợp, kháng thể đặc hiệu bốn tái tổ hợp, kháng thể chuỗi đơn, scFv, scFv-Fc, SMTP, và kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể.

"Vùng biến đổi chuỗi nặng" hoặc " V_H " có nghĩa là một phần của chuỗi nặng bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 và vùng khung bao quanh.

“Vùng biến đổi chuỗi nhẹ” hoặc “V_L” có nghĩa là một phần của chuỗi nhẹ bao gồm CDR4, CDR5 và CDR6 và vùng khung bao quanh.

“CDR” có nghĩa là vùng siêu biến của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, xác định tính đặc hiệu liên kết / tính hỗ trợ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Thứ tự của các CDR theo sáng chế được xác định hoàn toàn dựa theo số lượng.

“Epitop” ở đây dùng để chỉ một phần của kháng nguyên, được nhận diện bởi kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Cụ thể là thuật ngữ này dùng để chỉ một phần của CD33, có thể được nhận diện bởi kháng thể.

“mAbs” được sử dụng ở đây dùng để chỉ các kháng thể đơn dòng.

Kháng thể có thể có một hoặc nhiều "chức năng đáp ứng lại kích thích" dùng để chỉ hoạt tính sinh học có thể quy định cho vùng Fc (vùng Fc trình tự nguyên gốc hoặc vùng Fc biến thể của trình tự axit amin) của kháng thể. Các ví dụ về chức năng đáp ứng lại kích thích của kháng thể gồm liên kết CIq; gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity -CDC); liên kết thụ thể Fc; cơ chế gây độc do tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody- dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC); sự thực bào; sự điều hòa giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), v.v..

"Fv chuỗi đơn" hoặc mảnh kháng thể "scFv" bao gồm vùng V_H và V_L của kháng thể, trong đó các vùng này có mặt chuỗi polypeptit đơn. Polypeptit Fv thường còn bao gồm liên kết polypeptit trong đó liên kết giữa vùng V_H và V_L có khả năng làm cho scFv tạo thành cấu trúc mong muốn để liên kết kháng nguyên. Bài báo về scFv, xem Plückthun trong *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Tác nhân gắn kết chẳng hạn như kháng thể "được định hướng", "liên kết" hoặc "liên kết đặc hiệu" kháng nguyên quan tâm (tức là, kháng nguyên đích) là một tác nhân có khả năng liên kết với kháng nguyên bằng ái lực đủ để tác nhân gắn kết hữu ích trong việc hướng đích tế bào biểu hiện kháng nguyên. Thông thường, tác nhân gắn kết liên kết với ái lực ít nhất bằng khoảng $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, và liên kết với kháng nguyên đã được xác định trước bằng ái lực ít nhất lớn hơn gấp hai lần so với ái lực để liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein) trừ kháng nguyên đã được xác định trước hoặc kháng nguyên có liên quan mật thiết.

"Dẫn xuất của kháng thể " được sử dụng ở đây dùng để chỉ kháng thể, như được xác định ở trên, được biến đổi bằng sự gắn kết cộng hóa trị của phân tử khác loại như,

ví dụ, bằng cách gắn polypeptit khác loại, hoặc bằng sự glycosyl hóa, sự khử glycosyl hóa, axetyl hóa hoặc phosphoryl hóa hoặc cải biến khác thường không liên quan với kháng thể. Theo một vài phương án, phân tử khác loại không phải là tác nhân trị liệu. Theo một vài phương án, phân tử khác loại không biểu hiện tác dụng kim hãm tế bào hoặc gây độc tế bào.

Tài liệu tham khảo cho toàn bộ tất cả các thuật ngữ và quy trình được sử dụng ở đây là Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (January 15, 2001).

Tác nhân gắn kết CD33 liên kết đặc hiệu với thụ thể, CD33, được kết hợp với quần thể tế bào đích được đưa ra. CD33 là một thành viên trong họ siglec biểu hiện trên các tế bào của dòng tạo huyết, gồm các tế bào tủy ác tính tiền thân, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua, và dưỡng bào. CD33 cũng được biểu hiện trên tế bào khối u liên quan đến bệnh tăng sinh dưỡng bào hoặc tăng sinh tế bào tủy ác tính, gồm hội chứng bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính và hội chứng loạn sản tủy, và trên các tế bào gốc bệnh bạch cầu. Kháng thể hướng đích CD33 và cách sử dụng chúng đã được mô tả khái quát (xem, ví dụ, Pierelli et al., 1993, *Br. J. Haematol.* 84:24-30; Matutes et al., 1985, *Hematol. Oncol.* 3: 179- 186; Taussig et al., 2005, *Blood* 106:4086- 4092; Florian et al., 2006, *Leuk. & Lymph.* 47:207-222).

Theo một vài phương án, tác nhân gắn kết CD33 là kháng thể (ví dụ kháng thể đơn dòng). Kháng thể đơn dòng hữu ích có thể là các tập hợp chung nguồn gốc của kháng thể với CD33 (ví dụ, vùng ngoại bào của CD33 ở người). Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody - mAb) có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật này gồm, nhưng không giới hạn với kỹ thuật tế bào lai đầu tiên được mô tả bởi Köhler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), kỹ thuật lai tế bào B ở người (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), và kỹ thuật tế bào lai EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Các kháng thể này có thể thuộc lớp globulin miễn dịch gồm IgG, IgM, IgE, IgA và IgD và lớp phụ bất kỳ của chúng. Tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng có thể được nuôi cấy *in vitro* hoặc *in vivo*.

Kháng thể đơn dòng hữu ích gồm, nhưng không giới hạn với, kháng thể đơn dòng ở người, kháng thể đơn dòng được làm giống như của người, kháng thể đơn dòng thể khảm và mảnh kháng thể có hoạt tính chức năng của các kháng thể này.

Kháng thể CD33 hữu ích gồm các kháng thể có thể đạt được hiệu quả trị liệu

bằng các cơ chế khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như cơ chế gây độc do tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity -ADCC), sự thực bào tế bào kháng sự phụ thuộc (anti-dependent cell phagocytosis - ADCP) và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC). Ví dụ kháng thể có thể qua trung gian ADCC bằng cách tương tác với các tế bào đáp ứng lại kích thích như tế bào NK, bạch cầu đơn nhân, và đại thực bào.

Kháng thể tái tổ hợp, như kháng thể thể khảm và kháng thể đơn dòng được làm giống như của người, bao gồm cả phần của người và không phải của người, có thể được tạo thành bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn. (Xem, ví dụ, Cabilly et al., Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 4816567; và Boss et al., Đơn yêu cầu cấp patent Số 4816397; cả hai được kết hợp ở đây để tham khảo). “Kháng thể được làm giống như của người” là các phân tử kháng thể từ loài không phải là người có một hoặc nhiều vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining regions-CDRs) từ các loài không phải là người và vùng khung từ phân tử globulin miễn dịch ở người. (Xem, ví dụ, Queen, Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 5585089, được kết hợp ở đây để tham khảo). Kháng thể đơn dòng được làm giống như của người và thể khảm có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ sử dụng các phương pháp được mô tả trong Công bố quốc tế số WO 87/02671; Công bố patent châu Âu số 0184187; Công bố patent châu Âu số 0171496; Công bố patent châu Âu số 0173494; Công bố quốc tế số WO 86/01533; Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 4816567; Công bố patent châu Âu Số 012023; Berter et al., 1988, Science 240: 1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al. 1985, Nature 314:446-449; Shaw et al, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison, 1985, Science 229: 1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Đơn xin cấp Patent Mỹ số 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; và Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060: mỗi tài liệu được kết hợp ở đây để tham khảo.

Các kháng thể đơn dòng ở người có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 7308-7312; Kozbor et al, 1983, Immunology Today 4:72-79; Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16; và Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số

5939598 và 5770429).

Kháng thể đầy đủ ở người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng chuột chuyển gen không thể biểu hiện các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch nội sinh, nhưng có thể biểu hiện các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Chuột chuyển gen được gây miễn dịch theo kiểu bình thường bằng kháng nguyên được lựa chọn, ví dụ, tất cả hoặc một phần của polypeptit CD33. Các kháng thể đơn dòng được định hướng đối với kháng nguyên có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật lai tế bào thông thường. Gen chuyển globulin miễn dịch ở người được giữ lại bởi sự sắp xếp lại gen chuyển của chuột trong suốt quá trình biệt hóa tế bào B, và sau đó trải qua sự chuyển lớp và đột biến xôma. Do đó, sử dụng kỹ thuật này, có thể tạo ra các kháng thể IgG, IgA, IgM và IgE hữu ích trong trị liệu. Tổng quan về kỹ thuật này để sản xuất các kháng thể ở người, xem, ví dụ, Lonberg and Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93. Thảo luận chi tiết của kỹ thuật này để sản xuất kháng thể người và kháng thể đơn dòng ở người và phương thức chuẩn để sản xuất kháng thể này, xem, ví dụ, Đơn xin cấp Patent Mỹ số 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; và 5545806. Các kháng thể người khác có thể thu được thương mại từ, ví dụ, Medarex (Princeton, NJ), thu được bằng chuột được gây miễn dịch.

Các kháng thể người đầy đủ nhận diện epitop được lựa chọn cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật được ưu tiên là "lựa chọn được định hướng". Theo cách tiếp cận này, kháng thể đơn dòng không phải từ người được lựa chọn, ví dụ, kháng thể ở chuột, được sử dụng để định hướng lựa chọn của kháng thể ở người đầy đủ nhận diện epitop giống nhau. (Xem, ví dụ, Jespers et al, 1994, *Biotechnology* 12:899-903). Các kháng thể người cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, gồm các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (xem, ví dụ, Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al, 1991, *J Mol Biol* 222:581; Quan and Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics*, In *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu and Fick Jr., eds., Marcel Dekker, New York, NY, Chapter 20, pp. 427-469).

Các mảnh kháng thể hữu ích gồm, nhưng không giới hạn với, đoạn F(ab')₂, đoạn Fab', đoạn Fab, Fvs, kháng thể chuỗi nhẹ (single chain antibodies - SCAs) (ví dụ, như được mô tả trong Đơn xin cấp Patent Mỹ Số 4946778: Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; và Ward et al, 1989, *Nature* 334: 544-54), scFv, scFv-Fc, FvdsFv, kháng thể đặc hiệu nhỏ, kháng thể

đặc hiệu kép, kháng thể đặc hiệu ba, kháng thể đặc hiệu bốn, SMIP (xem, ví dụ, Đơn xin cấp Patent Mỹ được công bố Số 2005-0238646) và phân tử bất kỳ khác bao gồm một hoặc nhiều CDR và có tính đặc hiệu tương tự với kháng thể.

Theo các phương án khác, kháng thể là protein dung hợp của kháng thể, hoặc mảnh có chức năng hoạt động của nó, được nối với protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được dung hợp thông qua liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết peptit), tại đầu cuối N hoặc đầu cuối C với trình tự axit amin của protein khác (hoặc phần của nó, thường ít nhất là 10, 20 hoặc 50 phần axit amin của protein) không phải là kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Theo một vài phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được liên kết đồng hóa trị với protein khác tại đầu cuối C của vùng biến đổi hoặc vùng cố định.

Kháng thể có thể được cải biến, ví dụ, bằng gắn kết cộng hóa trị của loại phân tử bất kỳ miễn sao gắn kết cộng hóa trị này cho phép kháng thể duy trì tính đặc hiệu miễn dịch liên kết kháng nguyên của nó. Ví dụ, dẫn xuất của kháng thể có thể là một kháng thể được cải biến khác, ví dụ, bằng sự glycosyl hóa, khử glycosyl hóa, axetyl hóa, pegyl hóa, phosphoryl hóa, amin hóa, sự giảm nhận diện bằng các nhóm bảo vệ/chặn đã biết, sự phân cắt protein, liên kết với protein khác, v.v.. Cải biến bất kỳ trong nhiều cải biến hóa học có thể được tiến hành bằng các kỹ thuật đã biết, gồm, nhưng không giới hạn với, sự phân cắt hóa học đặc hiệu, sự axetyl hóa, formyl hóa, sự tổng hợp chuyển hóa với sự có mặt của tunicamycin, hoặc chất tương tự. Ngoài ra, dẫn xuất còn có thể chứa một hoặc nhiều axit amin không tự nhiên.

Theo các phương án cụ thể, vẫn có mong muốn để cải thiện ái lực liên kết và/hoặc đặc tính sinh học khác của kháng thể. (Xem, ví dụ, Công bố patent Mỹ Số 2006-0003412 và 2006-0008882). Các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được tạo ra bằng cách đưa vào các thay đổi nucleotit thích hợp tạo thành axit nucleic mã hóa kháng thể khác, hoặc bằng sự tổng hợp peptit. Các cải biến này gồm, ví dụ, mất, và/hoặc thêm vào và/hoặc thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của mất, thêm, và/hoặc thay thế được tạo thành để thu được sản phẩm thiết kế cuối cùng, tạo ra sản phẩm thiết kế cuối cùng mang các đặc tính mong muốn. Các thay đổi axit amin cũng có thể biến đổi các quy trình sau dịch mã của kháng thể, như thay đổi số lượng hoặc sự định vị vị trí glycosyl hóa.

Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc hoặc vùng nhất định của kháng thể là các vị trí có lợi để gây đột biến được gọi là "gây đột biến quét alanin" như được mô tả

bởi Cunningham and Wells (1989, Science 244: 1081-1085). Ở đây, một gốc hoặc nhóm các gốc đích được xác định (ví dụ, các gốc tích điện chẳng hạn như arg, asp, his, lys, và glu) và được thay thế bằng axit amin tích điện âm hoặc trung hòa điện (thường là alanin hoặc polyalanin) để ảnh hưởng đến sự tương tác của axit amin với kháng nguyên. Các vị trí axit amin đó thể hiện độ nhạy chức năng với các sự thay thế sau đó được sàng lọc bằng cách đưa vào thêm các biến đổi tương tự hoặc các biến đổi khác tại, hoặc cho, các vị trí thay thế. Do đó, mặc dù vị trí biến đổi trình tự axit amin được định trước, nhưng bản chất của đột biến thực chất không được định trước. Ví dụ, để phân tích đặc tính của đột biến tại vị trí được đưa ra, đột biến ngẫu nhiên hoặc quét alanin hoặc được tiến hành tại codon hoặc vùng đích và những biến thể của kháng thể được biểu hiện được sàng lọc theo hoạt tính mong muốn.

Các trình tự axit amin thêm có thể bao gồm các dung hợp ở đầu amino- và/hoặc carboxyl- trong phạm vi chiều dài từ một gốc đến chuỗi polypeptit chứa hàng trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như các trình tự bổ sung của các gốc axit amin đơn lẻ hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về các đoạn thêm ở đầu cuối cùng gồm kháng thể với gốc methionyl đầu cuối N hoặc kháng thể được dung hợp với polypeptit gây độc tế bào.

Một loại kháng thể khác là biến thể thay thế axit amin của kháng thể. Các biến thể này có ít nhất một gốc axit amin trong phân tử kháng thể được thay thế bởi gốc khác. Các vị trí được quan tâm nhất để gây đột biến thay thế gồm các vùng siêu biến, nhưng các biến đổi trong vùng khung cũng được thiết kế.

Các cải biến đáng kể về các đặc tính sinh học của kháng thể có thể được hoàn thành bởi cách chọn lọc các thay thế mà khác biệt đáng kể về hiệu quả của chúng để duy trì (a) cấu trúc của mạch khung polypeptit trong vùng thay thế, ví dụ, có dạng tấm hoặc dạng xoắn ốc, (b) sự tích điện hoặc tính không ưa nước của phân tử tại vị trí đích, hoặc (c) kích thước của mạch bên. Các gốc tìm thấy trong tự nhiên được chia thành các nhóm trên cơ sở các đặc tính phổ biến của mạch bên:

- (1) tính kỵ nước: norleuxin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) tính ưa nước trung tính: xys, ser, thr;
- (3) tính axit: asp, glu;
- (4) tính bazơ: asn, gin, his, lys, arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến sự định hướng của mạch: gly, pro; và
- (6) tính thơm: trp, tyr, phe.

Những thay thế không bảo thủ sẽ dẫn đến sự trao đổi của thành viên trong các lớp

này với một lớp khác.

Mong muốn biến đổi kháng thể về chức năng đáp ứng lại kích thích, ví dụ, để tăng cường tính gây độc do tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC), sự thực bào tế bào chống sự phụ thuộc (anti-dependent cell phagocytosis - ADCP) và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC) của kháng thể. Cụ thể, hoạt tính ADCC có thể được tăng cường bằng cách đưa các đột biến axit amin trong vùng cố định của kháng thể (Lazar et al., PNAS 103, 11, 4005–4010, 2006). Điều này có thể đạt được bằng cách đưa một hoặc nhiều thay thế axit amin vào vùng Fc của kháng thể, xem, ví dụ, Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ được công bố số 2006-0160996. Nói cách khác hoặc ngoài ra, (các) gốc xystein có thể được đưa vào trong vùng Fc, nhờ đó cho phép sự tạo thành liên kết disulfua liên chuỗi trong vùng này. Kháng thể homodime do đó được tạo ra có thể có khả năng nội nhập được cải thiện và/hoặc CDC và ADCC tăng lên. (Xem, ví dụ, Caron et al., 1992, J Exp. Med 176:1191-1195; và Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922.) Kháng thể homodime với hoạt tính kháng khối u tăng cao cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các mối liên kết chéo nhị chức khác loại như được mô tả trong Wolff et al., 1993, Cancer Research 53:2560-2565. Nói cách khác, kháng thể có thể được thiết kế có các vùng Fc kép và có thể nhờ đó có sự phân giải bổ thể tăng cao và các khả năng ADCC. (Xem, ví dụ, Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230.)

Các cải biến khác về vùng Fc được đề xuất trong lĩnh vực kỹ thuật, cả trong tài liệu khoa học và trong tài liệu patent, ví dụ trong EP 0307434, WO 9304173, WO 9734631, WO 9744362, WO 9805787, WO 9943713, WO 9951642, WO 9958572, WO 02060919, WO 03074679, WO 2004016750, WO 2004029207, WO 2004063351, WO 2004074455, WO 2004035752, WO 2004099249, WO 2005077981, WO 2005092925, WO 2006019447, WO 2006031994, WO 2006047350, WO 2006053301, WO 2006088494 và WO 2007041635.

Theo các phương án được ưu tiên, các kháng thể theo sáng chế là biến thể Fc với đoạn thay thế axit amin tại vị trí 332 và/hoặc 239 và/hoặc 236. Theo các phương án được ưu tiên, các kháng thể theo sáng chế có các đột biến trong vùng Fc được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) thay thế đơn tại vị trí 332, tốt hơn là I332E;
- ii) tổ hợp của thay thế tại vị trí 239 và 332, tốt hơn là S239D/I332E;

iii) tổ hợp của thay thế tại vị trí 236 và 332, tốt hơn là G236A/ I332E;

iv) tổ hợp của thay thế tại vị trí 236, 239 và, 332, tốt hơn là G236A /S239D/I332E.

Trong phương án được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế là đưa các đột biến trong vùng Fc tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ axit amin tại các vị trí 332 và/hoặc 239 và/hoặc 236 theo thứ tự đánh số Kabat EU. Được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế là sự thay thế tại vị trí 239 và 332, đặc biệt là S239D/I332E.

Biến thể Fc trong các kháng thể theo sáng chế được xác định theo các cải biến axit amin hợp thành chúng. Do đó, ví dụ, I332E là biến thể Fc với thay thế I332E tương ứng với polypeptit Fc gốc. Tương tự, S239D/I332E xác định biến thể Fc với các thay thế S239D và I332E và S239D/I332E/G236A xác định biến thể Fc với các thay thế S239D, I332E, và G236A tương ứng với polypeptit Fc gốc.

Để làm tăng thời gian bán rã của huyết thanh của kháng thể, một epitop có thể kết hợp epitop liên kết thụ thể giải cứu có thể được gắn vào kháng thể (đặc biệt là mảnh kháng thể) như được mô tả trong Đơn xin cấp Patent Mỹ số 5739277, ví dụ. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop liên kết thụ thể giải cứu" dùng để chỉ epitop của vùng Fc của phân tử IgG (ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, hoặc IgG₄) chịu trách nhiệm làm tăng thời gian bán rã in vivo của huyết thanh của phân tử IgG.

Kháng thể có thể được glycosyl hóa tại vị trí được bảo tồn trong các vùng cố định của chúng (xem, ví dụ, Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Mạch bên oligosacarit của globulin miễn dịch có thể ảnh hưởng đến chức năng của protein (xem, ví dụ, Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32: 1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29: 4175-4180), và sự tương tác nội phân tử giữa các phần của glycoprotein có thể ảnh hưởng đến cấu hình và bề mặt ba chiều được thể hiện của glycoprotein (xem, ví dụ, Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Oligosacarit cũng có thể đảm nhiệm hướng đích một glycoprotein nhất định tới các phân tử đã biết dựa trên các cấu trúc nhận diện đặc biệt. Ví dụ, đã có báo cáo rằng trong phân tử IgG được galactosyl hóa, gốc oligosacarit 'trượt' khỏi không gian bên trong C_H2 và gốc axetylglucosamin, đầu cuối N trở nên sẵn sàng để liên kết với protein liên kết mannoza (xem, ví dụ, Malhotra et al. 1995, Nature Med. 1 :237-243). Loại bỏ bằng glycopeptidaza của oligosacarit từ CAMPATH-1H (kháng thể IgG1 đơn dòng ở chuột được làm giống như của người tái tổ hợp nhận diện kháng nguyên CDw52 của tế bào

lympho ở người) được tạo ra trong các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) dẫn đến sự giảm hoàn toàn sự phân giải qua trung gian bổ thể (complement mediated lysis - CMCL hoặc CDC) (Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32:131, 1-1318), trong khi sự loại bỏ chọn lọc các gốc axit sialic sử dụng neuraminidaza dẫn đến không có sự giảm CMCL. Sự glycosyl hóa các kháng thể được báo cáo ảnh hưởng đến ADCC. Cụ thể là, các tế bào CHO với sự biểu hiện được điều hòa bởi tetracyclin của $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII), glycosyltransferaza xúc tác sự tạo thành GlcNAc có cấu trúc góc phân giác, được báo cáo có hoạt tính ADCC được cải thiện (xem, ví dụ, Umana et al., 1999, *Nature Biotech.* 17: 176-180).

Sự glycosyl hóa các kháng thể thường là liên kết-N hoặc liên kết-O. Liên kết-N dùng để chỉ sự gắn gốc carbohydrat với mạch bên của gốc asparagin. Trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là trình tự nhận diện để gắn bằng enzym gốc carbohydrat với mạch bên asparagin. Do đó, sự có mặt của các trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa có hiệu quả. Sự glycosyl hóa liên kết-O dùng để chỉ sự gắn một trong các đường N-axetylglaxiosamin, galactosa, hoặc xyloza với axit hydroxyamino, phổ biến nhất là serin hoặc threonin, mặc dù vậy 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Biến thể glycosyl hóa của kháng thể là các biến thể trong đó kiểu glycosyl hóa của kháng thể được biến đổi. Nói cách khác có nghĩa là loại bỏ một hoặc nhiều gốc carbohydrat có trong kháng thể, thêm một hoặc nhiều gốc carbohydrat vào kháng thể, thay đổi thành phần của sự glycosyl hóa (tức là, kiểu glycosyl hóa), mức độ glycosyl hóa, hoặc tương tự.

Việc thêm các vị trí glycosyl hóa vào kháng thể thường được tiến hành bằng cách thay đổi trình tự axit amin để nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả ở trên (với các vị trí glycosyl hóa liên kết-N). Sự thay thế cũng có thể được tiến hành bằng cách bổ sung, hoặc thay thế bằng, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự của kháng thể gốc (với vị trí glycosyl hóa liên kết-O). Tương tự, sự loại bỏ các vị trí glycosyl hóa có thể được tiến hành bằng sự thay đổi axit amin trong vị trí glycosyl hóa nguyên bản của kháng thể.

Trình tự axit amin thường được biến đổi bằng cách biến đổi trình tự axit nucleic mà nó phụ thuộc. Phương pháp này gồm, nhưng không giới hạn với, phân lập từ nguồn

tự nhiên (trong trường hợp trình tự axit amin biến thể có sẵn trong tự nhiên) hoặc tạo ra bằng sự gây đột biến (hoặc đột biến điểm trực tiếp) thông qua trung gian oligonucleotit, gây đột biến bằng PCR, hoặc gây đột biến caset ở giai đoạn sớm trong quá trình tạo ra biến thể hoặc không phải biến thể của kháng thể.

Sự glycosyl hóa (gồm kiểu glycosyl hóa) của kháng thể cũng có thể được biến đổi mà không làm thay đổi trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit mà nó phụ thuộc. Glycosyl hóa phụ thuộc rất nhiều vào tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện kháng thể. Vì loại tế bào được sử dụng để biểu hiện glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, kháng thể, nên như các liệu pháp tiềm năng hiếm khi là tế bào nguyên thủy, các biến thể quan trọng trong kiểu glycosyl hóa của kháng thể có thể được mong đợi. (Xem, ví dụ, Hse et al., 1997, Biol. Chem. 272:9062-9070.) Ngoài sự lựa chọn các tế bào chủ, các yếu tố ảnh hưởng đến sự glycosyl hóa trong khi sản xuất tái tổ hợp các kháng thể gồm chế độ phát triển, thành phần môi trường, tỷ trọng canh trường, sự sản sinh oxy, pH, quy trình tinh sạch, và các yếu tố tương tự. Các phương pháp khác nhau được đề xuất để biến đổi kiểu glycosyl hóa đạt được trong sinh vật chủ cụ thể, bao gồm sự đưa vào hoặc biểu hiện quá mức của các enzym nhất định có liên quan đến sự sản xuất oligosacarit (xem, ví dụ, Đơn xin cấp Patent Mỹ số 5047335; 5510261; và 5278299). Sự glycosyl hóa, hoặc kiểu glycosyl hóa nhất định, có thể được loại bỏ bằng enzym từ glycoprotein, ví dụ sử dụng endoglycosidaza H (Endo H). Ngoài ra, tế bào chủ tái tổ hợp có thể được xử lý gen, ví dụ, được tạo thành với thiếu hụt trong quá trình xử lý các loại polysacarit nhất định. Kỹ thuật này và các kỹ thuật tương tự đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Cấu trúc glycosyl hóa của kháng thể có thể dễ dàng được phân tích bằng các kỹ thuật thông thường để phân tích carbohydrat, gồm phương pháp sắc ký lectin, NMR, khối phổ, HPLC, GPC, phân tích thành phần monosacarit, sự phân hủy tuần tự bằng enzym, và HPAEC-PAD, sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi anion pH cao để tách oligosacarit dựa trên điện tích. Phương pháp giải phóng oligosacarit để cho các mục đích phân tích cũng đã được biết đến, và gồm, mà không giới hạn, phương pháp xử lý bằng enzym (thường được tiến hành bằng cách sử dụng peptit-N-glycosidaza F/endo- β -galactosidaza), sự khử mà sử dụng môi trường kiềm khắc nghiệt để giải phóng các cấu trúc liên kết-O chính, và phương pháp hóa học sử dụng hydrazin khan để giải phóng oligosacarit liên kết-N và -O.

Kháng thể cũng có thể có các biến thể (ví dụ, thay thế, mất hoặc thêm) trong các

gốc axit amin tương tác với thụ thể Fc. Cụ thể, các kháng thể có thể có các cải biến về gốc axit amin được nhận biết có liên quan đến sự tương tác giữa vùng kháng Fc và thụ thể FcRn (xem, ví dụ, Công bố quốc tế số WO 97/34631).

Theo khía cạnh rộng nhất, sáng chế đề cập đến tác nhân gắn kết CD33 liên kết với CD33 ở người và được xác định bởi

a) có vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR4, CDR5 và CDR6, trong đó CDR1 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1-14, CDR2 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 15-28, CDR3 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 29-42, CDR4 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 43-56, CDR5 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 57-70, CDR6 có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 71-84, hoặc

b) nhận diện epitop trong đó trình tự axit amin FFHPIPYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO: 141) của CD33 ở người.

Sáng chế còn đề xuất tác nhân gắn kết CD33 trong đó cơ chế động học nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 với ít nhất 30% lượng khác thể ban đầu còn lại trên bề mặt tế bào của các tế bào HL60 tại thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

Nhận thấy rằng tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế liên kết với epitop khác với lintuzumab, xem ví dụ 4 ở đây. Cả hai epitop (SEQ ID NO: 141 và SEQ ID NO: 142) không được biểu hiện quá mức. Chắc chắn rằng các epitop khác nhau trên vùng ngoại bào của CD33, được nhận diện bởi tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế và bởi lintuzumab, là lý do của trạng thái nội nhập khác nhau và khả năng ADCC của tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế và lintuzumab (tham khảo ví dụ 2 và 3 ở đây).

Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất 40% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 giữ lại trên bề mặt tế bào tại thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

Theo một phương án được ưu tiên, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 85-98 and vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 99-112.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gắn kết CD33 có chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 113-126 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 127-140.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gắn kết CD33 có ái lực với cả CD33 ở người và CD33 ở khỉ cynomolgus với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gắn kết CD33 được làm giống như của người.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gắn kết CD33 nguyên vẹn ở người.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gắn kết CD33 còn bao gồm chức năng đáp ứng lại kích thích.

Theo phương án được ưu tiên, chức năng đáp ứng lại kích thích được trung gian bởi vùng Fc.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gắn kết CD33 bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc điều biến chức năng của vùng Fc.

Theo phương án được ưu tiên, sự điều biến chức năng của vùng Fc là sự tăng ADCC bằng ít nhất 10%, tốt hơn là 50% hoặc 100%.

Tác nhân gắn kết CD33 được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế được liệt kê trong bảng 1:

Số STT	Dòng ID#	CDR1 SeqID	CDR2 SeqID	CDR3 SeqID	CDR4 SeqID	CDR5 SeqID	CDR6 SeqID	V _H SeqID	V _L SeqID	Chuỗi nặng SeqID	Chuỗi nhẹ SeqID
1	280-03-08	1	15	29	43	57	71	85	99	113	127
2	280-21-09	2	16	30	44	58	72	86	100	114	128
3	280-29-12	3	17	31	45	59	73	87	101	115	129
4	280-31-01	4	18	32	46	60	74	88	102	116	130
5	280-31-01	5	19	33	47	61	75	89	103	117	131
	(mut)										
6	280-34-02	6	20	34	48	62	76	90	104	118	132
7	280-50-01	7	21	35	49	63	77	91	105	119	133
8	280-50-01	8	22	36	50	64	78	92	106	120	134
	(mut)										
9	280-61-07	9	23	37	51	65	79	93	107	121	135
10	283-03-03	10	24	38	52	66	80	94	108	122	136
11	283-05-01	11	25	39	53	67	81	95	109	123	137
12	283-07-03	12	26	40	54	68	82	96	110	124	138
13	283-11-03	13	27	41	55	69	83	97	111	125	139
14	283-14-01	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140

Bảng 1

Điều trị bệnh ung thư

Các công bố khác nhau mô tả CD33 là chất chỉ thị bề mặt tế bào trên các tế bào AML và CML sơ cấp được biểu hiện trên các tế bào khối u ác tính nằm trong khoảng từ 70% đến 100% người bệnh (Scheinberg et al., 1989; Hauswirt et al., 2007; Plesa et al., 2007; Webber et al., 2008). CD33 được biểu hiện trên các đường bào dạng tủy ác tính, là loại chiếm phần lớn trong các tế bào ác tính trong máu ngoại vi và tủy xương của người bệnh bị bệnh bạch cầu, và trên các tế bào gốc bệnh bạch cầu, số lượng tương đối nhỏ các tế bào ít được biệt hóa trong tủy xương được đặc trưng bởi khả năng tự tái sinh và duy trì sự phân hóa thứ bậc của dòng tế bào bạch cầu ác tính. Tính khả thi lâm sàng để hướng đích CD33 bằng cách sử dụng kháng thể được chứng minh bởi Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamizin), thể tiếp hợp kháng thể-calicheamycin được chấp nhận để điều trị người bệnh AML bị tái phát mà không thể chọn được cách điều trị khác. Một cách tiếp cận khác được định hướng theo hướng CD33 là sự phát triển của lintuzumab (SGN-33, HuM195), kháng thể đơn dòng IgG1 được làm giống như của người cho thấy các dấu hiệu ban đầu về hiệu quả trong các thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I (Raza et al., 2009). Kết hợp lại, đã có dữ liệu phong phú về, cả tiền lâm sàng và lâm sàng, nhấn mạnh sự thích hợp và tính khả thi của CD33 hướng đích để điều trị AML và các khối u ác tính dương tính CD33 khác.

Bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính (Acute myeloid leukemia -AML) là khối u ác tính của dòng tế bào dạng tủy của các tế bào máu trắng. Sự tạo u bệnh lý huyết học này là bệnh về máu và bệnh về tủy xương, nếu không được điều trị, thường gây tử vong trong vòng vài tuần đến vài tháng. Tỷ lệ ước tính 30000 trường hợp bị AML tại Mỹ và 47000 trường hợp ở Liên minh châu Âu (số liệu hiện hành trong 10 năm được xác nhận bởi Mattson-Jack, 2010). AML là dạng phổ biến nhất của bệnh bạch cầu cấp tính ở người lớn (khoảng 90%), bao gồm khoảng 33% các trường hợp bị bệnh bạch cầu mới. Độ tuổi trung bình của người bệnh được chẩn đoán với AML là 67 tuổi. AML chiếm khoảng 1,2% tỉ lệ tử vong do bệnh ung thư tại Mỹ.

AML gây ra các triệu chứng không rõ ràng như sút cân, mệt mỏi, sốt, và đổ mồ hôi đêm. AML được chẩn đoán bằng xét nghiệm máu, xét nghiệm tủy xương, và các thử nghiệm tại phòng thí nghiệm để xác định kiểu phụ AML và để xác định các quyết định điều trị.

Trị liệu AML phụ thuộc rất nhiều vào độ tuổi và tình trạng hoạt động của người bệnh. Người bệnh có thể chịu đựng cảm ứng tăng liều (và sau đó củng cố và duy trì)

của hóa trị liệu sẽ được điều trị chuyên sâu bằng hỗn hợp của các loại thuốc gây độc tế bào. Những người bệnh này có khả năng đạt được đáp ứng hoàn toàn khoảng 75%. Trong tập hợp những người bệnh này, kết quả điều trị là chấm dứt được bệnh. Tuy nhiên, sự tái phát AML xảy ra trong khoảng một nửa số người bệnh trong vòng một năm sau khi đạt được sự đáp ứng hoàn toàn. Tỷ lệ bệnh ngừng tiến triển trong thời gian dài trong khoảng 30%.

Tuy nhiên, khi tuổi càng cao thì việc chẩn đoán hoặc sự tồn tại của cùng tình trạng bệnh không cho phép sử dụng liệu pháp cảm ứng tăng liều dẫn đến kết quả điều trị giảm nhẹ. Vì vậy, tỷ lệ thuyên giảm bị giảm đáng kể ở những người bệnh cao tuổi với AML. Tỷ lệ sống trung bình của người bệnh cao tuổi với AML là dưới 6 tháng.

Theo một khía cạnh, tác nhân gắn kết CD33 hữu ích để điều trị bệnh ung thư, chẳng hạn như trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư và/hoặc làm giảm hội chứng suy giảm sức khỏe cả về thể chất lẫn tinh thần do bệnh ung thư, hoặc ngăn chặn hoặc trì hoãn sự tái phát của bệnh ác tính huyết học (ví dụ, bệnh bạch cầu), ở động vật có vú, tốt hơn là người bệnh. Tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc được sử dụng đồng thời với chất trị liệu khác. Theo một vài phương án, tác nhân gắn kết CD33 được sử dụng đồng thời với các tiêu chuẩn chăm sóc bằng hóa học trị liệu. Tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng dưới dạng thể không tiếp hợp (ví dụ, thể không tiếp hợp với xytotoxin) hoặc là dạng thể tiếp hợp.

Trong phần nhỏ này, "người bệnh" là người hoặc động vật có vú khác mà trải qua việc điều trị, hoặc được chẩn đoán bị bệnh ung thư.

Theo một vài phương án, tác nhân gắn kết CD33 hữu ích để trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư và/hoặc làm giảm hội chứng suy giảm sức khỏe về cả thể chất lẫn tinh thần do bệnh ung thư ở người bệnh bằng cách sử dụng cho người bệnh cần điều trị một liều dùng hữu hiệu tác nhân gắn kết CD33. Không bị ràng buộc bởi một cơ chế đặc biệt nào, tác nhân gắn kết CD33 liên kết với tế bào đáp ứng kích thích hoặc tế bào kèm của các dòng tế bào đơn nhân hoặc tủy (ví dụ, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào đuôi gai, và bạch cầu trung tính), nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự sản xuất các xytokin, chemokin và yếu tố sinh trưởng khác nhau từ các tế bào đáp ứng lại kích thích hoặc tế bào kèm và/hoặc tế bào khối u. Các xytokin, chemokin và yếu tố sinh trưởng này, có thể thúc đẩy sự phát triển và tăng sinh của các tế bào khối u và/hoặc góp phần vào hội chứng suy giảm sức khỏe về cả thể chất lẫn tinh thần do bệnh ung thư, gồm, nhưng không giới hạn với, interleukin-1 β (IL-1 β), yếu tố hoại tử khối u (tumor

necrosis factor- α -TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interferon- γ (IFN- γ), yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (vascular endothelial growth factor - VEGF), yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (leukemia inhibitory factor - LIF), protein hóa hướng động tế bào đơn nhân (monocyte chemoattractant protein-1 - MCP-1), RANTES, interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12), metaloproteinaza chất nền 2 (matrix metalloproteinase 2- MMP2), IP-10 và/hoặc protein gây viêm đại thực bào 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α - MIP1 α). Tác nhân gắn kết CD33 cũng có thể làm giảm sự di chuyển của đại thực bào đến vị trí của tế bào khối u.

Theo một vài phương án, việc sử dụng liệu dùng hữu hiệu tác nhân gắn kết CD33 cho người bệnh làm giảm mức của ít nhất một xytokin, chemokin hoặc yếu tố sinh trưởng, mà xytokin, chemokin hoặc yếu tố sinh trưởng có thể thúc đẩy sự phát triển và tăng sinh các tế bào khối u, thúc đẩy sự di chuyển của các tế bào đáp ứng lại kích thích không phải khối u, như đại thực bào có liên quan đến khối u (tumor associated macrophage-TAMS), vùng lân cận của vị trí khối u và/hoặc góp phần vào hội chứng suy giảm sức khỏe về cả thể chất lẫn tinh thần do bệnh ung thư. Theo các phương án cụ thể, xytokin, chemokin hoặc yếu tố sinh trưởng ví dụ như interleukin-1 β (IL-1 β), yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor- α - TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interferon- γ (IFN- γ), yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (vascular endothelial growth factor - VEGF), yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (leukemia inhibitory factor - LIF), protein hóa hướng động bạch cầu đơn nhân-1 (monocyte chemoattractant protein-1 - MCP-1), RANTES, interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12), metaloproteinaza chất nền 2 (matrix metalloproteinase 2 - MMP2), IP-10 và/hoặc protein gây viêm đại thực bào 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α - MIP1 α).

Theo một phương án khác, phương pháp được đề xuất để trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư bằng cách cho bệnh nhân sử dụng chế độ trị liệu hiệu quả tác nhân gắn kết CD33 mà có thể liên kết đặc hiệu với CD33. Kết quả của việc sử dụng tác nhân gắn kết CD33, sự tiến triển của bệnh ung thư bị trì hoãn, như bằng cách làm giảm sự phát triển hoặc tăng sinh các tế bào khối u, làm giảm sự di căn, làm giảm mức của ít nhất một xytokin, chemokin hoặc yếu tố sinh trưởng, làm giảm các tế bào đáp ứng lại kích thích không ác tính trong vùng lân cận của các tế bào khối u, hoặc tế bào tương tự.

Theo một phương án khác, phương pháp được đề xuất để làm giảm khối lượng

của khối u ở người bệnh bằng cách sử dụng cho người bệnh một chế độ hữu hiệu tác nhân gắn kết CD33 mà có thể liên kết đặc hiệu với CD33. Kết quả của việc sử dụng tác nhân gắn kết CD33, khối u ở người bệnh bị kìm hãm lại hoặc bị giảm xuống, chẳng hạn như bằng cách làm giảm kích thước hoặc khối lượng của khối u, làm giảm mức độ của ít nhất một xytokin, chemokin hoặc yếu tố sinh trưởng, làm giảm tế bào đáp ứng lại kích thích không phải ác tính trong vùng lân cận của tế bào khối u, ức chế sự di chuyển của đại thực bào trong vùng lân cận của tế bào khối u, làm giảm số lượng các tế bào đáp ứng lại kích thích không phải ác tính (ví dụ, TAMS hoặc đại thực bào) ở khối u, hoặc bằng cách tương tự.

Theo một phương án khác, phương pháp được đề xuất để làm giảm khối lượng của khối u hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư ở người bệnh bằng cách sử dụng cho người bệnh một chế độ trị liệu hữu hiệu tác nhân gắn kết CD33 mà có thể liên kết đặc hiệu với CD33. Kết quả của việc sử dụng tác nhân gắn kết CD33, khối u ở người bệnh bị kìm hãm hoặc bị giảm, chẳng hạn như bằng cách phục hồi các tế bào đáp ứng lại kích thích miễn dịch như tế bào NK hoặc đại thực bào hoặc bạch cầu đơn nhân, có thể phá hủy tế bào khối u bằng các cơ chế gây miễn dịch.

Cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) là cơ chế do tế bào đáp ứng lại kích thích miễn dịch gây ra có thể góp phần vào hoạt tính kháng khối u của kháng thể đơn dòng (Weiner GJ. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res.* 2007;39(1-3):271-8). Sự tương quan của ADCC với hiệu quả kháng khối u được chứng minh trong các mô hình tiền lâm sàng, ví dụ trong các mô hình khối u ở chuột (ví dụ Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):443-6). Dữ liệu từ các thử nghiệm lâm sàng hỗ trợ sự tương quan của ADCC với hiệu quả lâm sàng của các kháng thể trị liệu (e.g. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 1;21(21):3940-7. Epub 2003 Sep 15). Các tương tác của kháng thể đơn dòng với thụ thể Fc trên các tế bào miễn dịch góp phần vào ADCC. Fc của kháng thể có thể được biến đổi để biểu hiện ái lực tăng cao với thụ thể Fc (ví dụ Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug 7;58(5-6):640-56. Epub 2006 May 23). Ái lực tăng cao với thụ thể Fc này tạo ra hoạt tính

ADCC tăng cao có thể dẫn đến hiệu quả chống khối u răng cao ở người bệnh.

Theo các phương án khác nhau được mô tả trong phần này, tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư dương tính với CD33 (ví dụ, bệnh ung thư bao gồm các tế bào ung thư biểu hiện quá mức CD33 trên bề mặt tế bào của chúng, hoặc biểu hiện CD33 tại mức được xem là có thể chấp nhận được để trị liệu bởi các kháng thể CD33). Tác nhân gắn kết CD33 cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư không biểu hiện quá mức CD33 trên tế bào đáp ứng lại kích thích không phải ác tính liên quan đến mô bình thường thuộc loại tương tự. Bệnh ung thư có thể, ví dụ, không phải bệnh lý huyết học ác tính hoặc là bệnh lý huyết học ác tính. Trong các ví dụ cụ thể, bệnh lý huyết học ác tính có thể dương tính với CD33 và có thể, ví dụ, bệnh bạch cầu bạch huyết cấp tính, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy đơn nhân mạn tính, bệnh bạch cầu nội hồng cầu, bệnh bạch cầu nguyên bào nhân không lồ cấp tính, u lympho mô bào, xacom dạng tủy, chứng rối loạn tăng sinh dưỡng bào hoặc hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome - MDS). Theo một vài phương án, bệnh lý huyết học ác tính là khối u ác tính dương tính với CD33, như bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính hoặc hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome - MDS).

Theo các phương án khác nhau được mô tả trong phần này, tác nhân gắn kết CD33 có thể là kháng thể kháng CD33 không được tiếp hợp. Ví dụ, kháng thể có thể là kháng thể nguyên vẹn của người, kháng thể thể khảm hoặc được làm giống như của người, chẳng hạn như kháng thể M 195 khảm hoặc được làm giống như của người. Kháng thể cũng có thể là kháng thể khác, chẳng hạn như kháng thể cạnh tranh với kháng thể M 195 để liên kết đặc hiệu với CD33. Kháng thể có thể liên kết với epitop tương tự như kháng thể M 195 hoặc với epitop khác.

Theo các phương án khác, tác nhân gắn kết CD33 có thể được liên kết (ví dụ, được tiếp hợp) với chất gây độc tế bào. Chất gây độc tế bào có thể, ví dụ, độc tố peptit, chẳng hạn như saporin, rixin, clotoxin, ngoại độc tố pseudomonas, nội độc tố pseudomonas hoặc độc tố bạch hầu. Chất gây độc tế bào cũng có thể là độc tố hóa học (tức là, không phải dạng peptit), như calicheamixin, doxorubixin, camptothecin, daunorubixin, tác nhân gắn kết ADN khác. Chất gây độc tế bào cũng có thể là auristatin, maytansinoid, dolastatin, hoặc chất phong bế vi ống khác.

Tác nhân gắn kết CD33 là kháng thể kháng CD33 có thể được sử dụng cho người bệnh qua đường trong tĩnh mạch hoặc đường dưới da với liều lượng khoảng 0,1mg/kg

hoặc ít hơn đến khoảng 25mg/kg, tốt hơn là 1,0mg/kg đến khoảng 10mg/kg. Tác nhân gắn kết CD33 là mảnh kháng thể kháng CD33 hoặc protein liên kết CD33 khác có thể được sử dụng với liều dùng tương đương với liều dùng nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến khoảng 25mg/kg. Từ 1,0mg/kg đến khoảng 10mg/kg kháng thể nguyên vẹn. Tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng qua đường tĩnh mạch hoặc đường dưới da cho người bệnh theo kế hoạch là, ví dụ, hàng ngày, hàng tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần (tức là, ba tuần một lần) hoặc hàng tháng, hoặc kết hợp của chúng, cho người bệnh. Tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng trong khoảng thời gian ít nhất một tháng, ít nhất hai tháng, ít nhất ba tháng, ít nhất bốn tháng, ít nhất năm tháng, ít nhất sáu tháng, hoặc nhiều hơn, nếu cần. Theo một vài phương án, giai đoạn điều trị (trước đây) bằng tác nhân gắn kết CD33 được tiếp theo giai đoạn duy trì, trong đó liều dùng tác nhân gắn kết CD33 được sử dụng ít thường xuyên hơn trong giai đoạn điều trị. Ví dụ, liều dùng duy trì có thể được sử dụng hàng tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc hàng tháng, trong khoảng thời gian từ 1 đến 6 tháng. Liều dùng trong giai đoạn duy trì có thể giống với liều dùng trong giai đoạn điều trị.

Điều trị bệnh huyết học ác tính thuyên giảm

Theo một khía cạnh khác, các phương pháp được đề xuất để ngăn chặn hoặc trì hoãn sự tái phát của bệnh huyết học ác tính (ví dụ như, bệnh bạch cầu) ở người bệnh bằng cách cho người bệnh thuyên giảm từ bệnh huyết học ác tính sử dụng một liều lượng hữu hiệu tác nhân gắn kết CD33, dẫn đến việc kìm hãm hoặc trì hoãn sự tái phát sau đó của bệnh lý huyết học ác tính. Tác nhân gắn kết CD33 liên kết đặc hiệu với CD33 trên bề mặt của các tế bào bệnh huyết học ác tính (ví dụ, tế bào bệnh bạch cầu) và/hoặc các tế bào đáp ứng lại kích thích không ác tính.

Trong bản mô tả này, "người bệnh" thường là người đang trải qua điều trị, hoặc được chẩn đoán bị bệnh huyết học ác tính. Theo một vài phương án, bệnh huyết học ác tính là bệnh huyết học ác tính dương tính với CD33. Bệnh huyết học ác tính gồm, nhưng không giới hạn với, bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (acute lymphoblastic leukemia - ALL), bệnh bạch cầu cấp thể tủy (acute myelogenous leukemia - AML), bệnh bạch cầu thể tủy mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy đơn nhân mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào tóc. Chứng rối loạn máu có liên quan, không giới hạn với, hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome - MDS), chứng xơ hóa tủy xương, bệnh tăng sinh tủy xương (ví dụ, bệnh tăng hồng cầu vô căn (polycythemia vera - PV, PCV hoặc PRV),

chứng tăng tiểu cầu nguyên phát (essential thrombocytosis - ET), và bệnh amyloid do chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ "bệnh huyết học ác tính dương tính với CD33" dùng để chỉ bệnh huyết học ác tính được mô tả bởi sự biểu hiện của CD33 trên bề mặt của các tế bào ác tính. Bệnh huyết học dương tính với CD33 gồm, nhưng không giới hạn với, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính (Acute myeloid leukemia - AML), bệnh bạch cầu tủy xương mạn tính (chronic myeloid leukemia - CML), bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy đơn nhân mạn tính, bệnh bạch cầu tiểu cầu, hội chứng loạn sản tủy, chứng rối loạn tăng sinh tủy xương, bệnh thiếu máu dai dẳng, chứng loạn sản tạo huyết chất sinh huyết, bệnh bạch cầu lympho, hoặc bệnh bạch cầu không biệt hóa.

Theo một vài phương án, phương pháp gồm việc sử dụng cho bệnh nhân đang thuyên giảm từ bệnh lý huyết học ác tính dương tính với CD33 với một chế độ trị liệu hữu hiệu tác nhân gắn kết CD33, nhờ đó sự tái phát của bệnh lý huyết học ác tính được ngăn chặn hoặc trì hoãn. Theo một vài phương án, người bệnh thiếu các tế bào có thể phát hiện của bệnh lý huyết học ác tính. Như được sử dụng ở đây, "thiếu tế bào có thể phát hiện" được xác định bằng các phương pháp chẩn đoán hoặc tiên lượng chuẩn. Người bệnh thuyên giảm từ AML thường biểu hiện sự giảm đi các đặc điểm lâm sàng không bình thường, sự đếm huyết cầu bình thường trở lại và sự tạo huyết bình thường trong tủy xương với <5% tế bào máu chưa trưởng thành, tổng số đếm bạch cầu trung tính >1000-1500, tổng số đếm tiểu huyết cầu >100000, và sự biến mất dòng vô tính bệnh bạch cầu. Xem, ví dụ, The Merck Manual, Sec. 11, Ch. 138 (17th ed. 1997): Estey, 2001, Cancer 92(5): 1059-1073.

Tác nhân gắn kết CD33 có thể, ví dụ, là kháng thể liên kết đặc hiệu với CD33 và bệnh huyết học ác tính có thể là bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính (Acute myeloid leukemia - AML), bệnh bạch cầu tủy xương mạn tính (chronic myeloid leukemia - CML), bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy đơn nhân mạn tính, bệnh bạch cầu tuyến giáp, hội chứng loạn sản tủy, chứng rối loạn tăng sinh tủy xương, bệnh thiếu máu dai dẳng, chứng loạn sản tạo huyết chất sinh huyết, bệnh bạch cầu lympho, hoặc bệnh bạch cầu không được biệt hóa.

Theo một vài phương án, người bệnh thuyên giảm từ bệnh lý huyết học ác tính không trải qua sự cấy ghép tủy xương. Sự cấy ghép tủy xương có thể là sự cấy ghép tủy xương tự rưng hoặc dị sinh.

Loại bệnh ung thư sau đây đặc biệt thích hợp để điều trị bởi các kháng thể theo

sáng chế:

Bệnh ung thư lây truyền bằng đường máu, gồm, nhưng không giới hạn với: bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính "ALL", bệnh bạch cầu tế bào B nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu tế bào T nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính "AML", bệnh bạch cầu tiền tủy bào cấp tính "APL", bệnh bạch cầu tủy xương dòng mono cấp tính, bệnh bạch cầu tăng sinh nguyên tủy bào hồng cầu cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào nhân khổng lồ cấp tính, bệnh bạch cầu dòng tế bào tủy đơn nhân cấp tính, bệnh bạch cầu không phải tế bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu không được biệt hóa cấp tính, bệnh bạch cầu tủy xương mạn tính "CML", bệnh bạch cầu bạch huyết bào mạn tính "CLL", bệnh bạch cầu tế bào tóc, đa u tủy.

Bệnh bạch cầu mạn tính và cấp tính, thích hợp được điều trị bằng tác nhân gắn kết CD33 gồm: bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, bệnh bạch cầu tủy xương, bệnh bạch cầu bạch huyết bào, bệnh bạch cầu tủy bào và bệnh bạch cầu tiểu cầu. Ngoài ra còn có hội chứng loạn sản tủy, chứng rối loạn tăng sinh tủy xương, bệnh thiếu máu dai dẳng, chứng loạn sản tạo huyết chất sinh huyết, bệnh bạch cầu lympho, hoặc bệnh bạch cầu không được biệt hóa có thể được điều trị bằng tác nhân gắn kết CD33.

Hỗn hợp với các hoạt chất khác

Tùy thuộc vào chứng rối loạn cần được điều trị, tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu khác, cụ thể là được chọn từ sự tác nhân phá hủy ADN, khử metyl hóa ADN hoặc tác nhân gắn kết tubulin hoặc hợp chất có hoạt tính trị liệu ức chế sự hình thành mạch, con đường truyền tín hiệu hoặc điểm kiểm soát nguyên phân trong tế bào ung thư hoặc có chức năng điều biến miễn dịch (immunomodulatory function - IMIDs).

Tác nhân trị liệu bổ sung có thể được sử dụng đồng thời với, tùy ý như một thành phần của được phẩm tương tự, hoặc trước hoặc sau khi sử dụng chất liên kết CD33.

Theo các phương án đã biết, tác nhân trị liệu bổ sung có thể, mà không giới hạn, một hoặc nhiều chất ức chế được chọn từ nhóm gồm các chất ức chế họ EGFR, họ VEGFR, VEGF, IGF-1R, thụ thể insulin, AuroraA, AuroraB, PLK và PI3 kinaza, FGFR, PDGFR, Raf, KSP hoặc PDK1.

Ví dụ khác về tác nhân trị liệu bổ sung là chất ức chế các CDK, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, Her2, Her3, c-Myc, Flt3, HSP90, chất đối kháng hedgehog, chất ức chế JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, phức hợp protein, Rho, chất ức chế sự truyền tín hiệu Wnt hoặc sự truyền tín hiệu Notch hoặc chất ức chế con

đường ubiquitin hóa.

Các ví dụ khác về chất trị liệu bổ sung là chất ức chế ADN polymeraza, topoisomeraza II, chất ức chế multityrosin kinaza, chất đối kháng CXCR4, chất ức chế IL3RA, chất đối kháng RAR, chất ức chế KIR, vacxin trị liệu miễn dịch, chất ức chế TUB, tác nhân gây cảm ứng Hsp70, chất ức chế họ IAP, chất ức chế ADN metyltransferaza, chất ức chế TNF, chất ức chế tyrosin kinaza thụ thể ErbB1, chất ức chế multikinaza, chất ức chế JAK2, chất ức chế RR, tác nhân cảm ứng tự hủy diệt, chất ức chế HGPRTaza, chất đối kháng thụ thể H2 histamin và chất chủ vận thụ thể CD25.

Ví dụ về chất ức chế Aurora, mà không giới hạn với, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237, BI847325 và ENMD-2076.

Ví dụ về chất ức chế PLK là GSK-461364, BI2536 và BI6727.

Ví dụ về chất ức chế Raf là BAY-73-4506 (cũng là chất ức chế VEGFR), PLX-4032, RAF-265 (cũng là chất ức chế VEGFR), sorafenib (cũng là chất ức chế VEGFR), XL-281, Nevavar (cũng là chất ức chế VEGFR) và PLX4032.

Ví dụ về chất ức chế KSP là ispinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355, và EMD-534085.

Ví dụ về chất ức chế src và/hoặc bcr-abl là dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL-228 (cũng là chất ức chế IGF-1R), nilotinib (cũng là chất ức chế PDGFR và cKit), imatinib (cũng là chất ức chế cKit), NS-187, KX2-391, AP-24534 (cũng là chất ức chế EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 và LS-104 (cũng là chất ức chế Flt3, Jak2).

Ví dụ về chất ức chế PDK1 là AR-12.

Ví dụ về chất ức chế Rho là BA-210.

Ví dụ về chất ức chế PI3 kinaza là PX-866, PX-867, BEZ-235 (cũng là chất ức chế mTor), XL-147, và XL-765 (cũng là chất ức chế mTor), BGT-226, CDC-0941.

Ví dụ về chất ức chế cMet hoặc HGF là XL-184 (cũng là chất ức chế VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (cũng là chất ức chế VEGFR), MGCD-265 (cũng là chất ức chế VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMab, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060, và E-7050.

Ví dụ về chất ức chế c-Myc là CX-3543.

Ví dụ về chất ức chế Flt3 là AC-220 (cũng là chất ức chế cKit và PDGFR),

KW-2449, LS-104 (cũng là chất ức chế bcr-abl và Jak2), MC-2002, SB-1317, lestaurtinib (cũng là chất ức chế VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (cũng là chất ức chế JAK2), XL-999 (cũng là chất ức chế cKit, FGFR, PDGFR và VEGFR), sunitinib (cũng là chất ức chế PDGFR, VEGFR và cKit), và tandutinib (cũng là chất ức chế PDGFR, và cKit).

Ví dụ về chất ức chế HSP90 là, tanespimyxin, alvespimyxin, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024, và SNX-5422.

Ví dụ về chất ức chế JAK/STAT là CYT-997 (cũng tương tác với tubulin), TG-101348 (cũng là chất ức chế Flt3), và XL-019.

Ví dụ về chất ức chế Mek là ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119, và XL-518.

Ví dụ về chất ức chế mTor là temsirolimus, deforolimus (cũng đóng vai trò làm chất ức chế VEGF), everolimus (chất ức chế VEGF bổ sung), XL-765 (cũng là chất ức chế PI3 kinaza), và BEZ-235 (cũng là chất ức chế PI3 kinaza).

Ví dụ về chất ức chế Akt là perifosin, GSK-690693, RX-0201, và trixiribin.

Ví dụ về chất ức chế cKit là masitinib, OSI-930 (cũng đóng vai trò làm chất ức chế VEGFR), AC-220 (cũng là chất ức chế Flt3 và PDGFR), tandutinib (cũng là chất ức chế Flt3 và PDGFR), axitinib (cũng là chất ức chế VEGFR và PDGFR), sunitinib (cũng là chất ức chế Flt3, PDGFR, VEGFR), và XL-820 (cũng đóng vai trò làm chất ức chế VEGFR- và PDGFR), imatinib (cũng là chất ức chế bcr-abl), nilotinib (cũng là chất ức chế bcr-abl và PDGFR).

Ví dụ về chất đối kháng hedgehog là IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926, và XL-139.

Ví dụ về chất ức chế CDK là selixiclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (cũng ức chế VEGFR2 và PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125, và SCH-727965.

Ví dụ về chất ức chế phức hợp protein là bortezomib, carfilzomib, và NPI-0052 (cũng là chất ức chế NFkappaB).

Ví dụ về chất ức chế phức hợp protein/chất ức chế đường NFkappaB là bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680, và SPC-839.

Ví dụ về chất ức chế đường ubiquitin hóa là HBX-41108.

Ví dụ về chất khử methyl hóa là 5-azaxitidin và dexitabin.

Ví dụ về chất chống tạo mạch là chất ức chế FGFR, PDGFR và VEGF(R), và thalidomit, các chất này được chọn từ, mà không giới hạn với, bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (cũng là chất ức chế CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs, thalidomit, CC-4047, lenalidomit, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, xediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (cũng là chất ức chế Flt3), sunitinib (cũng là chất ức chế cKit and Flt3), axitinib (cũng là chất ức chế cKit), lestaurtinib (cũng là chất ức chế Flt3 and PKC), vatalanib, tandutinib (cũng là chất ức chế Flt3 và cKit), pazopanib, PF-337210, aflibercept, E-7080, CHIR-258, sorafenib tosylat (cũng là chất ức chế Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (cũng là chất ức chế EGFR và Her2), BAY-57-9352 (cũng là chất ức chế Raf), BAY-73-4506 (cũng là chất ức chế Raf), XL-880 (cũng là chất ức chế cMet), XL-647 (cũng là chất ức chế EGFR và EphB4), XL-820 (cũng là chất ức chế cKit), nilotinib (cũng là chất ức chế cKit và bcr-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401, ENMD-2976 và BIBF1120.

Chất trị liệu khác cũng có thể được chọn từ chất ức chế EGFR, nó có thể là chất ức chế EGFR phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng EGFR. Ví dụ về kháng thể kháng EGFR, mà không giới hạn với, là xetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; ví dụ về chất ức chế EGFR phân tử nhỏ là gefitinib, erlotinib, vandetanib (cũng là chất ức chế VEGFR) và afatinib (cũng là chất ức chế Her2). Ví dụ khác về chất điều biến EGFR là độc tố dung hợp EGF.

Chất ức chế EGFR và/hoặc Her2 khác hữu ích để kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (cũng là chất ức chế VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769, và afatinib (chất ức chế kép Her2 và EGFR).

Chất ức chế ADN polymeraza hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là Ara-C/xytarabin, Clolar/ clofarabin.

Chất ức chế ADN metyltransferaza hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là Vidaza/azaxitidin.

Tác nhân cảm ứng gây chết theo chương trình hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là Trisenox/arsenix trioxit.

Chất ức chế topoisomeraza II hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo

sáng chế là idarubixin, daunorubixin và mitoxantron.

Chất đối kháng RAR hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là Vesanoit/tretinoin.

Chất ức chế HGPRTaza hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là Mercapto/mercaptopurin.

Chất đối kháng thụ thể histamin H2 hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là Xeplen/histamin dihydroclorua.

Chất chủ vận thụ thể CD25 hữu ích kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là IL-2.

Thuốc khác cũng có thể được chọn từ chất hướng đích đến các con đường IGF-1R và thụ thể insulin. Chất này gồm các kháng thể liên kết với IGF-1R (ví dụ CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGFR và các chất hóa học mới mà hướng đích vùng kinaza của IGF1-R (ví dụ OSI-906 hoặc BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Tác nhân khác có thể được kết hợp hữu dụng trong liệu pháp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế là các phân tử hướng đích CD20, gồm kháng thể đặc hiệu CD20 giống rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, ofatumumab, kháng thể CD20 được đánh dấu phóng xạ, giống tositumumab và ibritumomab tiuxetan hoặc protein hướng đích CD20 khác, chất tương tự SMIP Tru015, PRO-131921, FBT-A05, veltuzumab, R-7159.

Tác nhân gắn kết CD33 có thể được kết hợp với chất ức chế kháng nguyên bề mặt khác được biểu hiện trên bạch cầu, cụ thể là kháng thể hoặc phân tử giống kháng thể, ví dụ kháng CD2 (siplizumab), kháng CD4 (zanolimumab), kháng CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), kháng CD22 (epratuzumab), kháng CD23 (lumiliximab), kháng CD30 (iratumumab), kháng CD32B (MGA-321), kháng CD38 (HuMax-CD38), kháng CD40 (SGN40), kháng CD52 (alemtuzumab), kháng CD80 (galiximab).

Chất khác có thể được kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 là độc tố miễn dịch giống BL-22 (độc tố miễn dịch kháng CD22), inotuzumab ozogamixin (thể tiếp hợp kháng thể kháng CD23-calicheamixin), RFT5.dgA (độc tố Rixin kháng CD25 chuỗi A), SGN-35 (thể tiếp hợp E kháng CD30-auristatin), và gemtuzumab ozogamixin (thể tiếp hợp calicheamixin kháng CD33), MDX-1411 (thể tiếp hợp kháng CD70), hoặc kháng thể được đánh dấu phóng xạ giống ^{90}Y -epratuzumab (thể tiếp hợp miễn dịch

phóng xạ kháng CD22).

Ngoài ra, tác nhân gắn kết CD33 có thể được kết hợp với chất điều biến miễn dịch, chất, ví dụ kháng thể, cảm ứng gây chết theo chương trình hoặc biến đổi con đường truyền tín hiệu giống chất điều biến thụ thể TRAIL mapatumumab (chất chủ vận thụ thể TRAIL-1), lexatumumab (chất chủ vận thụ thể TRAIL-2), tigatuzumab, Apomab, AMG-951 và AMG-655; kháng thể kháng HLA-DR (giống 1D09C3), kháng CD74, chất ức chế phối tử yếu tố biệt hóa tế bào hủy xương (giống denosumab), chất đối kháng BAFF (giống AMG-623a) hoặc chất chủ vận của thụ thể giống Toll (ví dụ TLR-4 hoặc TLR-9).

Các thuốc khác có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế được chọn từ, nhưng không giới hạn với hocmon, chất tương tự hormon và chất kháng hormon (ví dụ tamoxifen, toremifen, raloxifen, fulvestrant, megestrol axetat, flutamit, nilutamit, bicalutamit, xyproteron axetat, finasterit, buserelin axetat, fludrocortison, floxymesteron, medroxyprogesteron, hydroxyprogesteron caproat, diethylstilbestrol, testosterone propionat, floxymesteron/chất tương đương, octreotit, arzoxifen, pasireotit, vapreotit, adrenocorticosteroid/ chất đối kháng, prednison, dexamethason, ainoglutethimit), chất ức chế aromataza (ví dụ anastrozol, letrozol, liarozol, exemestan, atamestan, formestan), chất chủ vận và chất đối kháng LHRH (ví dụ goserelin axetat, leuprolit, abarelix, xetrorelix, deslorelin, histrelin, triptorelin), chất chống chuyển hóa (ví dụ antifolat giống methotrexat, trimetrexat, pemetrexed, chất tương tự pyrimidin giống 5-flouraxil, flodeoxyuridin, capexitabin, dexitabin, nelarabin, 5-azaxytidin, và gemxitabin, purin và chất tương tự adenosin như mercaptopurin, thioguanin, azathioprin, cladribin và pentostatin, xytarabin, fludarabin, clofarabin); kháng sinh chống khối u (ví dụ antraxyclin giống doxorubixin, daunorubixin, epirubixin và idarubixin, mitomycin-C, bleomycin dactinomycin, plicamycin, splicamycin, actinomycin D, mitoxantron, mitoxantroneidarubixin, pixantron, streptozoxin, aphidicolin); dẫn xuất của platin (ví dụ xisplatin, oxaliplatin, carboplatin, lobaplatin, satraplatin); chất alkyl hóa (ví dụ estramustin, semustin, mecloetamin, melphalan, clorambuxil, busulphan, dacarbazin, xyclophosphamit, ifosfamid, hydroxyure, temozolomit, nitrosoure như carmustin và lomustin, thiotepa); chất chống nguyên phân (ví dụ vinca alkaloid giống vinblastin, vindesin, vinorelbin, vinflunin và vincristin; và taxan giống paclitaxel, docetaxel và chế phẩm của chúng, larotaxel; simotaxel, và epothilon giống ixabepilon, patupilon, ZK-EPO); chất ức chế

topoisomeraza (ví dụ epipodophylotoxin giống etoposít và etopophos, teniposit, amsacrin, topotecan, irinotecan, banoxantron, camptothexin) và chất hóa học trị liệu hỗn hợp như dẫn xuất của axit retinoic, amifostin, anagrelit, interferon alpha, interferon beta, interferon gama, interleukin-2, procarbazin, N-metylhydrazin, mitotan, và porfime, bexaroten, xelecoxib, etylenmin/metyl-melamin, thietienmelamin, trietylen thiophosphoramit, hexametylmelamin, và enzym L-asparaginaza, L-arginaza và metronidazol, misonidazol, desmetylmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, nicotinamit, 5-bromodeoxyuridin, 5-iododeoxyuridin, bromodeoxytytidin, erythrohydroxynonyl-adenin, antraxendion, GRN-163L (chất đối kháng mẫu telomeraza cạnh tranh), SDX-101 (chất chủ vận PPAR), talabostat (chất ức chế DPP), forodesin (chất ức chế PNP), ataxicept (chất đối kháng hòa tan hướng đích thành viên trong họ TNF BlyS và APRIL), chất trung hòa TNF-alpha (Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (chất ức chế CHK1/2), VNP-40101M (chất alkyl hóa ADN), SPC-2996 (chất ức chế bcl2 đối nghĩa), obatoclax (chất ức chế bcl2), enzastaurin (chất ức chế PKC beta), vorinistat (chất ức chế HDAC), romidepsin (chất ức chế HDAC), AT-101 (chất ức chế Bcl-2/Bcl-xL), plitidepsin (depsipeptit đa tác dụng), SL-11047 (chất điều biến chuyển hóa polyamin).

Tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp khác gồm phẫu thuật, sự cấy ghép tế bào gốc, trị liệu phóng xạ, liệu pháp nội tiết, chất cải biến đáp ứng sinh học, thân nhiệt cao và dùng lạnh để chữa bệnh và các tác nhân để giảm bớt tác dụng bất lợi (ví dụ thuốc chống nôn), G-CSF, GM-CSF, chất cảm quang như dẫn xuất hematoporphyrin, photofrin, dẫn xuất benzoporphyrin, Npe6, tin etioporphyrin, pheoborua-a bacterioclorophyl-a, naphtaloxyanin, phtaloxyanin, kẽm phtaloxyanin.

Dược phẩm và phương pháp sử dụng

Tác nhân gắn kết CD33 có thể có dạng bất kỳ mà cho phép chế phẩm sử dụng được cho người bệnh. Ví dụ, chế phẩm có thể có dạng chất rắn hoặc chất lỏng. Mô hình áp dụng được ưu tiên là qua đường ngoài đường tiêu hóa, bằng cách truyền hoặc tiêm (trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong bụng, trong da), nhưng mô hình áp dụng khác như bằng cách hít, qua da, qua đường trong mũi, qua má, qua đường miệng và trong khối u cũng có thể thích hợp. Sử dụng ngoài đường tiêu hóa gồm kỹ thuật truyền hoặc tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, tiêm trong stem. Theo một khía

cạnh, các chế phẩm được sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Theo một khía cạnh khác, hợp chất được sử dụng trong tĩnh mạch.

Dược phẩm có thể được bào chế để cho phép hợp chất có tính khả dụng sinh học khi sử dụng chế phẩm cho người bệnh. Chế phẩm có thể có dạng của đơn hoặc nhiều đơn vị liều dùng, trong đó, ví dụ, vật chứa chứa hợp chất dưới dạng sol khí có thể chứa nhiều đơn vị liều dùng.

Nguyên liệu được sử dụng để điều chế dược phẩm có thể không độc đối với lượng được sử dụng. Hiển nhiên đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng liều dùng tối ưu của (các) hoạt chất trong dược phẩm phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau. Các yếu tố có liên quan gồm, mà không giới hạn, đối tượng bị bệnh (ví dụ, người), dạng cụ thể của hợp chất, cách thức sử dụng, và chế phẩm được sử dụng.

Chất mang hoặc tá dược được sử dụng có thể là dạng hạt, để các chế phẩm, ví dụ, ở dạng bột. (Các) chất mang có thể là chất lỏng, với chế phẩm, ví dụ, dạng lỏng có thể tiêm. Chế phẩm có thể có dạng lỏng, ví dụ, tiêm ngoài ruột. Trong chế phẩm mà sử dụng bằng cách tiêm, có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất làm ẩm, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định và chất đẳng trương.

Chế phẩm lỏng, chúng có thể là dung dịch, huyền phù hoặc dạng tương tự khác, cũng có thể gồm một hoặc nhiều chất sau đây: chất pha loãng vô trùng như nước để tiêm, dung dịch nước muối, tốt hơn là nước muối sinh lý, dung dịch Ringer, natri clorua đẳng trương, dầu nền như mono- hoặc diglycerit tổng hợp có thể thích hợp làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù, polyetylen glycol, glyxerin, cyclodextrin, propylen glycol hoặc dung môi khác; chất ổn định như axit amin; chất hoạt động bề mặt như polysorbat; chất kháng vi khuẩn như rượu benzyl hoặc methyl paraben; chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; chất chelat hóa như axit etylendiamintetraaxetic; chất đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat; và chất điều chỉnh tính trương như natri clorua hoặc dextroza. Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được đựng trong ống thuốc, xi lanh dùng một lần hoặc lọ nhỏ đa liều bằng thủy tinh, nhựa hoặc vật liệu khác. Nước muối sinh lý là tá dược minh họa. Chế phẩm có thể tiêm tốt hơn là vô trùng.

Tác nhân gắn kết CD33 có thể được làm khô (được đông khô, sấy phun, sấy phun lạnh, làm khô bằng khí gần hoặc siêu tới hạn, sấy chân không, hong khô), được kết tủa

hoặc kết tinh hoặc giữ trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật giọt tu hoặc bằng sử dụng polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, tương ứng lần lượt là hydroxymethylxenluloza hoặc gelatin và poly-(metylmetylat), trong các hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và viên nang nano), trong nhũ tương phân tử lớn hoặc được kết tủa hoặc cố định trên chất mang hoặc bề mặt, ví dụ bằng kỹ thuật pcmc (vi tinh thể được phủ protein). Kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Hendrickson R. Ed.

Lượng chế phẩm hữu hiệu trong điều trị một chứng rối loạn hoặc bệnh lý cụ thể sẽ phụ thuộc vào bản chất của chứng rối loạn hoặc bệnh lý, và có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm in vitro hoặc in vivo có thể tùy ý được sử dụng để hỗ trợ xác định các khoảng liều dùng tối ưu. Liều dùng chính xác được sử dụng trong chế phẩm sẽ phụ thuộc vào đường dùng, và tính nghiêm trọng của bệnh hoặc chứng rối loạn, và nên được quyết định theo chỉ định của bác sỹ đa khoa và tình trạng của mỗi bệnh nhân.

Chế phẩm bao gồm một lượng hữu hiệu (các) thuốc hoặc (các) tác nhân để thu được liều dùng phù hợp. Thông thường, lượng này ít nhất là 0,01% của thuốc hoặc tác nhân được tính theo trọng lượng của chế phẩm. Khi hướng đến việc sử dụng theo đường miệng, lượng này có thể thay đổi đến khoảng từ 0,1% đến khoảng 80% tính theo trọng lượng của chế phẩm. Theo một khía cạnh, chế phẩm qua đường miệng có thể bao gồm từ khoảng 4% đến khoảng 50% hợp chất tính theo trọng lượng chế phẩm. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm này được điều chế để đơn vị liều dùng ngoài đường tiêu hóa; chứa từ 0,01% đến khoảng 2% tính theo trọng lượng hợp chất.

Để sử dụng trong tĩnh mạch, chế phẩm có thể chứa từ 1 đến 50mg thuốc hoặc tác nhân trên mỗi kg cân nặng của người bệnh. Theo một khía cạnh, chế phẩm có thể gồm từ khoảng 1, 1,5 hoặc 2,5 đến khoảng 50mg thuốc hoặc chất trên mỗi kg cân nặng của người bệnh. Theo một khía cạnh, lượng được sử dụng sẽ nằm trong khoảng từ 1, 1,5 hoặc 2,5 đến khoảng 25mg/kg khối lượng của thuốc hoặc tác nhân.

Theo một vài phương án, liều dùng được sử dụng cho người bệnh nhỏ hơn 0,1mg/kg đến khoảng 50mg/kg cân nặng của người bệnh. (Để quy biến đổi thành mg/mm², BSA bằng 1,8m² và cân nặng bằng 80kg có thể được sử dụng.)

Như được thảo luận trong bản mô tả, tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da cho người bệnh theo lịch trình tức là, ví dụ, hàng ngày,

hàng tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc hàng tháng cho người bệnh. Ví dụ, tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng hàng tuần, trong khoảng thời gian từ 2 đến 10 tuần, thường là từ 3 đến 6 tuần. Theo một vài phương án, chế độ liều dùng của tác nhân gắn kết CD33 duy trì nồng độ huyết thanh trong máu bằng ít nhất $5\mu\text{g/ml}$ hoặc ít nhất $10\mu\text{g/ml}$ trong suốt chu kỳ sử dụng theo liều lượng. Tác nhân gắn kết CD33 có thể được sử dụng, ví dụ, từ 1 đến 8, hoặc nhiều chu kỳ hơn. Theo một vài phương án, tác nhân gắn kết CD33 được sử dụng thường xuyên cho đối tượng.

Bằng cách ví dụ, sáng chế gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư, như bệnh ung thư dạng tủy, bằng cách sử dụng từ $0,1\text{mg/kg}$ đến 50mg/kg , ví dụ khoảng từ 1,5 đến 8 hoặc từ 2,5 đến 8mg/kg , kháng thể kháng CD33 hàng tuần theo sáng chế. Cách điều trị này thường có thể được sử dụng liên tục trong thời gian từ 1 đến 3 tháng, thường là khoảng hai tháng. Theo một phương án, chu trình liều sử dụng được duy trì cho đến khi giảm các tế bào ác tính chưa trưởng thành (tế bào blast) được nhận thấy. Ví dụ, việc sử dụng theo liều lượng liên tục trên 6 tháng. Cách điều trị này có thể tiếp theo sau bằng chu trình sử dụng với liều lượng ít thường xuyên hơn, bao gồm ví dụ như là trường hợp liều dùng hai tuần một lần (hoặc hai lần một tháng). Chu trình sử dụng theo liều dùng có thể được duy trì 1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng hoặc nhiều hơn để duy trì sự giảm tế bào ác tính chưa trưởng thành (tế bào blast) và/hoặc sự thuyên giảm bệnh.

Theo một vài phương án, tác nhân phòng bệnh có thể được sử dụng cùng với tác nhân gắn kết CD33 để giảm thiểu các phản ứng của quá trình truyền dịch. Tác nhân phòng bệnh thích hợp gồm, ví dụ, methyl prednisolon, diphenyldramin, axetaminophen hoặc tác nhân thích hợp khác. Tác nhân phòng bệnh có thể được sử dụng trước hoặc vào khoảng thời gian đồng thời với tác nhân gắn kết CD33.

(Các) thuốc hoặc (các) tác nhân hoặc chế phẩm có thể được sử dụng bằng đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh 1 liều, bằng sự hấp thụ qua niêm mạc da hoặc biểu mô (ví dụ, niêm mạc miệng, trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.). Việc sử dụng có thể toàn thân hoặc khu trú. Các hệ thống phân phối khác nhau đã được biết đến, ví dụ, sự bao gói trong liposom, vi hạt, vi nang, nang, v.v., và có thể được sử dụng để phân phối hợp chất. Theo các phương án đã biết, nhiều hơn một loại thuốc hoặc tác nhân hoặc chế phẩm được sử dụng cho người bệnh.

Mong muốn là phân phối một hoặc nhiều loại thuốc hoặc tác nhân hoặc chế phẩm cục bộ vào vùng cần điều trị, thích hợp với thuốc hoặc tác nhân. Điều này cũng có thể đạt được, ví dụ, và không giới hạn, bằng sự truyền cục bộ trong khi phẫu thuật; áp

dụng tại chỗ, ví dụ, kết hợp với sự băng bó vết thương sau khi phẫu thuật; bằng cách tiêm: bằng ống thông đường tiểu; bằng thuốc đạn; hoặc bằng sự cấy ghép, sự cấy ghép vật liệu xốp, không xốp, hoặc gelatin, bao gồm màng, như màng dạng dẻo kiểu cao su, hoặc sợi. Theo một phương án, việc sử dụng có thể được tiêm trực tiếp tại vị trí (hoặc vị trí trước) của bệnh ung thư, khối u hoặc mô tạo u hoặc mô tạo u trước.

(Các) thuốc hoặc (các) chất hoặc chế phẩm có thể được phân phối trong hệ thống giải phóng được kiểm soát, như bơm hoặc vật liệu polyme khác nhau. Theo một phương án khác, hệ thống giải phóng được kiểm soát có thể được đặt ở gần đích của (thuốc) hoặc (các) tác nhân hoặc chế phẩm, do đó chỉ giữ lại một phần liều dùng toàn thân (xem, ví dụ, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pp. 115-138, 1984). Hệ thống giải phóng được kiểm soát khác được tóm tắt bởi Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533) có thể được sử dụng.

Thuốc hoặc tác nhân được bào chế phù hợp với các quy trình thông thường dưới dạng thuốc thích hợp để sử dụng trong tĩnh mạch cho động vật, đặc biệt là người, thích hợp với thuốc hoặc chất. Thông thường, chất mang hoặc tá dược lỏng để sử dụng trong tĩnh mạch là dung dịch đệm chứa chất lỏng đẳng trương vô trùng. Nếu cần, chế phẩm cũng có thể gồm chất ổn định. Chế phẩm sử dụng trong tĩnh mạch có thể tùy ý bao gồm chất gây mê cục bộ như lignocain để làm giảm đau tại vị trí tiêm. Nói chung, thành phần được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn cùng nhau dưới dạng liều dùng đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột đông khô hoặc chất cô đặc không chứa nước trong vật chứa được bịt kín chặt như ống tiêm hoặc túi mà xác định được lượng hoạt chất. Trong đó thuốc hoặc tác nhân được sử dụng bằng cách truyền, nó có thể được phân tán, ví dụ, với chai truyền chứa nước hoặc nước muối loại dược phẩm vô trùng. Trong đó thuốc hoặc tác nhân được sử dụng bằng cách tiêm, ống tiêm chứa nước vô trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp để các thành phần được trộn trước khi sử dụng.

Chế phẩm chứa chất trị liệu cũng có thể được sử dụng theo các dạng liều dùng được dụng ví dụ như dưới dạng viên nén, viên thuốc hình thoi, huyền phù dạng dầu hoặc huyền phù chứa nước, hạt nhỏ, bột, huyền phù, viên nang, xi-rô, hoặc cồn ngọt. Chế phẩm được sử dụng qua đường miệng có thể chứa một hoặc nhiều chất tùy ý, ví dụ, chất tạo ngọt như fructoza, aspartam hoặc sacarin; chất tạo hương như bạc hà, dầu cây lộc đề, hoặc anh đào; chất tạo màu; và chất bảo quản, để tạo ra chế phẩm được dụng. Hơn nữa, dưới dạng viên nén hoặc viên tròn, chế phẩm có thể được bọc để trì hoãn sự phân hủy và sự hấp thụ trong dạ dày ruột nhờ đó tạo ra tác dụng được duy trì

liên tục trong khoảng thời gian kéo dài. Màng thẩm chọn lọc bao quanh hợp chất dẫn có hoạt tính thẩm thấu cũng thích hợp cho các thuốc hoặc chất được sử dụng qua đường miệng. Trong chất nền ở giai đoạn muộn hơn, dịch lỏng từ môi trường bao quanh viên nang được hấp thụ bởi hợp chất dẫn mà trương nở lên để thay thế tác nhân hoặc chế phẩm chất thông qua kẽ hở. Chất nền phân phối này có thể cung cấp profin phân phối bậc không (zero order) cần thiết trái ngược với profin có mẫu nhọn của các chế phẩm giải phóng trực tiếp. Vật liệu kéo dài thời gian như glyxerol monostearat hoặc glyxerol stearat cũng có thể được sử dụng.

Chế phẩm có thể gồm nhiều vật liệu khác nhau mà biến đổi dạng vật lý của đơn vị liều dùng lỏng hoặc rắn. Ví dụ, chế phẩm có thể gồm vật liệu tạo thành vỏ bọc quanh hoạt chất. Vật liệu tạo thành vỏ bọc thường là trơ, và có thể được chọn từ, ví dụ, đường, senlac, và chất bọc để dùng trong đường ruột khác. Nói cách khác, hoạt chất có thể được bọc trong nang gelatin.

Chế phẩm có thể được sử dụng cho người bệnh cần điều trị thường xuyên, hoặc trong khoảng thời gian, được xác định bởi bác sỹ theo dõi. Chế phẩm có thể được sử dụng trong khoảng thời gian 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày, 28 ngày, một tháng, hai tháng, hoặc khoảng thời gian lâu hơn. Điều này được hiểu rằng chế phẩm có thể được sử dụng trong khoảng thời gian bất kỳ giữa thời gian 1 ngày và hai tháng hoặc lâu hơn.

Sự sản xuất kháng thể

Kháng thể có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ hữu ích để tổng hợp các kháng thể, cụ thể, như bằng cách biểu hiện tái tổ hợp hoặc tổng hợp hóa học.

Sự biểu hiện kháng thể tái tổ hợp, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của chúng, thường có liên quan đến cấu trúc của axit nucleic mã hóa kháng thể. Nếu trình tự nucleotit của kháng thể đã được biết, axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc polypeptit của nó có thể được lắp ráp từ các oligonucleotit được tổng hợp hóa học (ví dụ, như được mô tả trong Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17: 242), có liên quan đến sự tổng hợp các oligonucleotit trùng lặp mà chứa các phần của trình tự mã hóa kháng thể, biến tính và gắn các oligonucleotit này, và tiếp đó khuếch đại oligonucleotit được gắn, ví dụ, bằng PCR.

Nói cách khác, phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc polypeptit của chúng có thể được tạo ra từ nguồn thích hợp. Nếu dòng vô tính chứa axit nucleic mã hóa

kháng thể cụ thể là không sẵn có, nhưng trình tự của kháng thể đã biết, axit nucleic mã hóa kháng thể có thể thu được từ nguồn thích hợp (ví dụ, thư viện kháng thể cDNA, hoặc thư viện cDNA được tạo ra từ mô bất kỳ hoặc tế bào biểu hiện globulin miễn dịch) bằng, ví dụ, sự khuếch đại PCR sử dụng các môi tổng hợp có thể lai với các đầu 3' và 5' của trình tự hoặc bằng cách tách dòng sử dụng đầu dò oligonucleotit đặc hiệu cho trình tự gen cụ thể.

Nếu kháng thể nhận diện đặc hiệu một kháng nguyên cụ thể mà không có bán trên thị trường (hoặc nguồn thư viện cDNA để tách dòng axit nucleic mã hóa globulin miễn dịch này là không có sẵn), kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng cách tạo miễn dịch cho người bệnh, hoặc mô hình động vật thích hợp như thỏ hoặc chuột, để tạo ra kháng thể đa dòng hoặc, tốt hơn nữa là, bằng cách tạo ra kháng thể đơn dòng, ví dụ, như được mô tả bởi Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) hoặc, như được mô tả bởi Kozbor et al. (1983, *Immunology Today* 4:72) hoặc Cole et al. (1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Mặc khác, dòng vô tính mã hóa ít nhất một phần Fab của kháng thể có thể thu được bằng cách sàng lọc thư viện biểu hiện Fab (ví dụ, như được mô tả trong Huse et al., 1989, *Science* 246, 1275-1281) với dòng vô tính của các mảnh Fab mà liên kết với kháng nguyên đặc hiệu hoặc bằng cách sàng lọc thư viện kháng thể (xem, ví dụ, Clackson et al, 1991, *Nature* 352:624; Hane et al, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937).

Ngay khi trình tự axit nucleic mã hóa ít nhất một vùng biến đổi của kháng thể thu được, nó có thể được đưa vào vector chứa trình tự nucleotit mã hóa vùng cố định của kháng thể (xem, ví dụ, Công bố quốc tế số WO 86/05807; WO 89/01036; và Đơn xin cấp Patent Mỹ số 5,122,464). Các vector chứa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ hoàn chỉnh cho phép sự biểu hiện của phân tử kháng thể hoàn chỉnh sẽ luôn sẵn sàng. Tiếp đó, axit nucleic mã hóa kháng thể có thể được sử dụng để đưa vào (các) đột biến thay thế hoặc (các) đột biến mất nucleotit cần thiết để thay thế (hoặc làm mất) một hoặc nhiều gốc xystein vùng biến đổi mà tham gia vào liên kết disulfua trong chuỗi với gốc axit amin không chứa nhóm sulfhydryl. Các cải biến này có thể được tiến hành bởi phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để đưa các đột biến hoặc đột biến mất nucleotit cụ thể trong trình tự nucleotit, ví dụ, nhưng không giới hạn với, sự gây đột biến hóa học và gây đột biến định hướng điểm in vitro (xem, ví dụ, Hutchinson et al, 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551).

Ngoài ra, các kỹ thuật được phát triển để sản xuất "kháng thể thể khảm" (xem, ví dụ, Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454). Kháng thể thể khảm là phân tử trong đó các phần khác nhau có nguồn gốc từ các loài động vật khác nhau, như các kháng thể có vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng ở chuột và vùng cố định globulin miễn dịch ở người, ví dụ, kháng thể được làm giống như của người.

Một khi trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể thu được, vector để sản xuất kháng thể có thể được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để thiết kế các vector biểu hiện chứa trình tự mã hóa kháng thể và tín hiệu điều khiển dịch mã và phiên mã thích hợp. Các phương pháp này gồm, ví dụ, kỹ thuật ADN tái tổ hợp in vitro, kỹ thuật tổng hợp, và tái tổ hợp di truyền in vivo. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong Sambrook et al (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Sambrook et al., 2001; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Publish., Cold Spring Harbor, N.Y.) và Ausubel et al. (eds., 1993-2006, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.).

Vector biểu hiện bao gồm trình tự nucleotit của kháng thể hoặc trình tự nucleotit có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật thông thường (ví dụ, kỹ thuật xung điện, sự truyền liposom, sự kết tủa hoặc sự truyền canxi phosphat), và các tế bào tạo thành tiếp đó được nuôi cấy bằng các kỹ thuật thông thường để tạo ra kháng thể. Theo các phương án cụ thể, sự biểu hiện kháng thể được điều hòa bởi trình tự khởi đầu (promoter) cơ định, cảm ứng hoặc đặc hiệu mô.

Tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp có thể là tế bào vi khuẩn như *Escherichia coli*, hoặc, tốt hơn là, tế bào eukaryot, đặc biệt để biểu hiện các phân tử globulin miễn dịch tái tổ hợp. Cụ thể là, tế bào động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO), kết hợp với vector chứa trình tự khởi đầu gen sớm trung gian chính từ cytomegalovirus ở người là hệ thống biểu hiện hữu hiệu cho các globulin miễn dịch (xem, ví dụ, Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2). Dòng tế bào CHO có thể, ví dụ, DG44 hoặc CHO-S. Trong một ví dụ khác, kháng thể có thể được biểu hiện

bằng cách sử dụng hệ thống CHEF. (xem, ví dụ, Đơn xin cấp Patent Số 5888809.)

Các hệ thống vector biểu hiện vật chủ khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện các kháng thể. Hệ thống biểu hiện vật chủ này thể hiện là vật mang bằng cách chứa các trình tự mã hóa của kháng thể có thể được tạo ra và tiếp đó được tinh sạch, nhưng cũng có thể thể hiện là các tế bào, khi được biến nạp hoặc gây nhiễm bằng trình tự mã hóa nucleotit thích hợp, biểu hiện phân tử globulin miễn dịch kháng thể in situ. Những hệ thống này gồm, nhưng không giới hạn với, các vi sinh vật như vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* và *B. subtilis*) được biến nạp bằng ADN thể thực khuẩn tái tổ hợp, vector biểu hiện ADN cosmit hoặc ADN plasmit chứa trình tự mã hóa globulin miễn dịch; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces pichia*) được biến nạp bởi vector biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa kháng thể; hệ thống tế bào côn trùng được lây nhiễm bởi vector biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, baculovirus) chứa trình tự mã hóa globulin miễn dịch; hệ thống tế bào thực vật được lây nhiễm bởi vector biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, virus khảm thực vật của hoa súp lơ (cauliflower mosaic virus - CaMV) và virus khảm thuốc lá (tobacco mosaic virus - TMV)) hoặc được biến nạp bởi các vector biểu hiện plasmit tái tổ hợp (ví dụ, Ti plasmit) chứa trình tự mã hóa kháng thể; hoặc hệ thống tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào COS, CHO, CHO-S, BH, 293, 293T hoặc 3T3) chứa cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ hệ gen của tế bào động vật (ví dụ, trình tự khởi đầu metallothionein) hoặc từ virus ở động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu muộn của adenovirus; trình tự khởi động 7,5K của virus bệnh đậu mùa).

Trong các hệ thống vi khuẩn, rất nhiều vector biểu hiện có thể được lựa chọn với ưu điểm dựa trên việc sử dụng định hướng đến loại kháng thể được biểu hiện. Ví dụ, khi một lượng lớn protein này được sản xuất, vector mà hướng đến việc biểu hiện các sản phẩm protein dung hợp ở mức cao mà dễ dàng được tinh sạch có thể được kì vọng. Các vector này gồm, nhưng không giới hạn với, vector biểu hiện *E. coli* pUR278 (Ruther et al, 1983, EMBO J. 2:1791-94), trong đó trình tự mã hóa kháng thể có thể được gắn riêng lẻ vào vector trong khung với vùng mã hóa lac Z với mục đích để tạo ra protein dung hợp; vector pIN (Inouye and Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke and Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); và tương tự. Vector pGEX cũng có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit ngoại lai dưới dạng protein dung hợp với glutathion S-transferaza (glutathione S-transferase - GST). Nói chung, protein dung hợp này có thể hòa tan và dễ dàng được tinh sạch từ các tế bào ly

giải bằng sự hấp thụ và liên kết với mạng lưới các hạt glutathion-agarosa sau đó bằng cách rửa giải với sự có mặt của glutathion tự do. Vector pGEX được thiết kế gồm có các vị trí phân cắt trombin hoặc yếu tố Xa proteaza do vậy mà sản phẩm gen đích được tách dòng có thể được giải phóng từ gốc GST.

Trong các hệ thống côn trùng, virus đa diện nhân từ *Autographa californica* (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus - AcNPV) hoặc virus tương tự từ Ruồi giấm *Drosophila melanogaster* có thể được sử dụng làm vector biểu hiện gen ngoại lai. Virus phát triển trong các tế bào *Spodopiera frugipenta*. Trình tự mã hóa kháng thể có thể được tách dòng riêng lẻ từ các vùng không cần thiết (ví dụ gen polyhedrin) của virus và được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động AcNPV (ví dụ trình tự khởi động polyhedrin).

Trong tế bào chủ của động vật có vú, rất nhiều các hệ thống biểu hiện trên cơ sở virus có thể được sử dụng. Trong trường hợp trong đó adenovirus là một vector biểu hiện, trình tự mã hóa kháng thể đang nói đến có thể được gắn vào phức hợp điều khiển sự dịch mã/phiên mã adenovirus, ví dụ, trình tự khởi động muộn và trình tự dẫn đầu gồm ba phần. Gen thể khảm này sau đó có thể được chèn vào hệ gen của adenovirus bằng sự tái tổ hợp in vitro hoặc in vivo. Sự chèn trong vùng không cần thiết của hệ gen của virus (ví dụ, vùng E1 hoặc E3) tạo ra virus tái tổ hợp có thể sống được và có khả năng biểu hiện phân tử globulin miễn dịch trong vật chủ được gây nhiễm. (Xem, ví dụ, Logan and Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Tín hiệu đặc trưng ban đầu cũng có thể cần thiết cho sự dịch mã hiệu quả trong các trình tự mã hóa kháng thể được chèn. Các tín hiệu này gồm codon khởi đầu ATG và trình tự liền kề. Ngoài ra, codon khởi đầu có liên quan hiệu quả đến khung đọc của trình tự mã hóa mong muốn để đảm bảo sự dịch mã toàn bộ đoạn chèn. Các tín hiệu điều khiển dịch mã ngoại sinh này và codon khởi đầu có thể có nguồn gốc khác nhau, cả tự nhiên và tổng hợp. Hiệu quả của sự biểu hiện có thể được tăng cường bởi sự bao gồm của các yếu tố tăng cường phiên mã thích hợp, yếu tố kết thúc phiên mã, v.v.. (xem, ví dụ, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Ngoài ra, chủng tế bào chủ có thể được lựa chọn để điều biến sự biểu hiện của trình tự được chèn, hoặc biến đổi và xử lý sản phẩm gen theo kiểu đặc trưng mong muốn. Các cải biến này (ví dụ, glycosyl hóa) và xử lý (ví dụ, phân cắt) các sản phẩm protein có thể quan trọng đối với chức năng của protein. Tế bào chủ khác nhau có các cơ chế đặc trưng và đặc biệt để xử lý sau dịch mã và cải biến protein và sản phẩm gen.

Dòng tế bào thích hợp hoặc hệ thống vật chủ có thể được chọn để đảm bảo sự cải biến và xử lý chính xác protein ngoại lai được biểu hiện. Cuối cùng, tế bào chủ eukaryot mang cơ chế tế bào thích hợp cho việc xử lý sản phẩm phiên mã ban đầu, glycosyl hóa, và sự phosphoryl hóa của sản phẩm gen có thể được sử dụng. Tế bào chủ ở động vật có vú gồm, nhưng không giới hạn với, CHO (ví dụ, DG44 hoặc CHO-S), VERY, BH, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 và T47D, CRL7030 và Hs578Bst.

Để sản xuất các protein tái tổ hợp với hiệu suất cao và thời gian tồn tại dài, sự biểu hiện ổn định được ưu tiên. Ví dụ, dòng tế bào biểu hiện ổn định kháng thể có thể được thiết kế. Tốt hơn là sử dụng vector biểu hiện chứa hệ thống tái bản có nguồn gốc virus, tế bào chủ có thể được biến nạp bằng ADN được kiểm soát bằng các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện thích hợp (ví dụ, trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, các trình tự, yếu tố kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, v.v.), và chất chỉ thị chọn lọc. Sau khi đưa vào ADN ngoại lai, tế bào được thiết kế có thể được cho phép phát triển trong thời gian từ 1 đến 2 ngày trong môi trường được làm giàu, và tiếp đó được chuyển vào môi trường chọn lọc. Chất chỉ thị chọn lọc trong plasmid tái tổ hợp đem lại tính kháng với sự chọn lọc và cho phép các tế bào tiếp hợp ổn định plasmid thành nhiễm sắc thể của chúng và phát triển để tạo thành locut sau đó có thể được tách dòng và được nhân rộng thành dòng tế bào. Phương pháp này có thể có ưu điểm để sử dụng để thiết kế dòng tế bào biểu hiện kháng thể. Dòng tế bào được thiết kế này đặc biệt hữu ích để sàng lọc và đánh giá kháng nguyên khối u tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng thể.

Rất nhiều các hệ thống chọn lọc có thể được sử dụng. Ví dụ, thymidin kinaza của virus bệnh ecpet (xem, ví dụ, Wigler et al., 1977, Cell 11:223), hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (xem, ví dụ, Szybalska and Szybalski, 1992, Proc. Natl Acad. Sci. USA 48:202), và gen adenin phosphoribosyltransferaza (xem, ví dụ, Lowy et al., 1980, Cell 22:817) có thể được sử dụng trong các tế bào tk-, hgppt- hoặc appt-, tương ứng. Ngoài ra, tính kháng chống chuyển hóa có thể được sử dụng như cơ sở của sự lựa chọn với các gen sau đây: DHFR, mang lại tính kháng cho metotrexat (xem ví dụ, Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-70; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-31); gpt, truyền tính kháng cho axit mycophenolic (xem, ví dụ, Mulligan and Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-76); neo, mang lại tính kháng cho aminoglycosit G-418 (xem, ví dụ, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993,

Arm. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; và May, 1993, TIB TECH 11(5): 155- 215) và hygromycin, mang lại tính kháng cho hygromycin (xem, ví dụ, Santerre et al., 1984, Gene 30:147-50). Các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật về kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng được mô tả trong Ausubel et al. (eds., 1993-2006, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression. A laboratory Manual, Stockton Press, NY; và trong Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds., 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; và Colberre-Garapin et al, 1981, 7. Mol. Biol. 150:1-14).

Mức biểu hiện của kháng thể có thể được tăng bởi sự khuếch đại vector (tham khảo, xem Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3., Academic Press, New York, 1987). Khi chất chỉ thị trong hệ thống vector biểu hiện kháng thể có thể khuếch đại, sự tăng mức của chất ức chế có trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ sẽ làm tăng số lượng bản sao của gen chỉ thị. Do vùng được khuếch đại có liên quan đến trình tự nucleotit của kháng thể, sự sản xuất kháng thể cũng sẽ tăng (xem, ví dụ, Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257-66).

Tế bào chủ có thể được lây nhiễm đồng thời bằng hai vector biểu hiện, vector thứ nhất mã hóa polypeptit có nguồn gốc từ chuỗi nặng và vector thứ hai mã hóa polypeptit có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ. Hai vector có thể chứa chất chỉ thị có thể chọn lọc giống hoặc khác nhau mà sự biểu hiện polypeptit chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương đương nhau. Mặt khác, vector đơn có thể được sử dụng để mã hóa cho cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong các trường hợp này, chuỗi nhẹ thường được đặt trước chuỗi nặng để tránh sự dư thừa độc tố từ chuỗi nặng tự do (xem, ví dụ, Proudfoot, 1986, Nature 322:562-65; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197-9). Trình tự mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể bao gồm cDNA hoặc ADN hệ gen.

Khi kháng thể có thể được biểu hiện tái tổ hợp, nó có thể được tinh sạch bằng cách sử dụng phương pháp tinh sạch thích hợp bất kỳ của kháng thể, ví dụ, bằng phương pháp sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, cụ thể bởi ái lực với kháng nguyên đặc hiệu sau protein A, và phương pháp sắc ký cột theo kích thước), ly tâm, độ tan khác nhau, hoặc bằng kỹ thuật chuẩn bất kỳ khác để tinh sạch các protein.

Tài liệu bao hàm tất cả các bước được sử dụng để tạo thành kháng thể đơn dòng

theo sáng chế là Yokoyama et al., “Production of Monoclonal Antibodies”, Current Protocols in Immunology, Unit 2.5, 2006.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Ái lực với CD33

Tác nhân gắn kết CD33 có K_D với cả CD33 ở người và ở khỉ cynomolgus có ái lực bằng 10nM hoặc nhỏ hơn trên dòng tế bào HL60 và CD33 ở khỉ cynomolgus HEK293, tương ứng.

Mười bốn tác nhân gắn kết CD33 (kháng thể đơn dòng nguyên vẹn ở người được liệt kê trong bảng 1 lần lượt từ số 1 đến 14) với CD33 ở người và khỉ cynomolgus được xác định bằng phép phân tích FACS Scatchard như được mô tả trong Brockhoff et al., (Cytometry. 1994 Sep 1;17(1):75-83) trên các tế bào biểu hiện CD33 (dòng tế bào HL60 có nguồn gốc từ AML, dòng tế bào CD33 ở khỉ cynomolgus HEK293 tái tổ hợp). Tóm lại, các lần pha loãng tác nhân gắn kết CD33 được tiến hành trong đĩa 96 giếng bắt đầu với từ 100 đến 400nM trong giếng thứ nhất (80 μ l), sau đó bằng 11 bước pha loãng (1:2, 40 + 40 μ l). 50 μ l dung dịch pha loãng tác nhân gắn kết CD33 được bổ sung vào các ống FACS, 150 μ l tế bào ($0,8 \times 10^6/\text{ml} = 1,2 \times 10^5$ tế bào/ống) được bổ sung vào mỗi ống FACS. Tế bào được trộn nhẹ và được ủ trong thời gian 1 giờ trên đá. Sau đó 50 μ l kháng thể thứ hai được gắn FITC (nồng độ 15 μ g/ml; mAb ở chuột kháng IgG người) được bổ sung vào, trộn, và ủ trong thời gian 30 phút trên đá. 4ml PBS pH=7,2 chứa 0,02% axit được bổ sung sau đó, tế bào được tạo thành pellet (dạng viên nhỏ) và được tạo huyền phù lại trong 300 μ l PBS pH=7,2 và đưa vào phân tích FACS sử dụng BD FACS Canto. Tất cả các bước thử nghiệm được tiến hành trên đá ướt, tất cả các lần pha loãng tác nhân gắn kết CD33 được tiến hành trong PBS/ 0,5% BSA + 0,02% axit. Sự chuẩn hóa FACS được tiến hành bằng cách sử dụng Quantum FITC MESF (Premix) Beads (Bangs Laboratories). Tất cả các mẫu được đo bằng cách sử dụng các thông số FACS tương tự. Tỷ lệ của IgG được liên kết so với IgG tự do được tính từ các giá trị MFI tại các nồng độ tác nhân gắn kết CD33 khác nhau và được hiển thị dưới dạng Scatchard blot. Đường hồi quy được rút ra thông qua các điểm dữ liệu tạo thành, độ dốc của đường này tương ứng với giá trị âm của hằng số gắn kết. Các kết quả được liệt kê trong bảng 2.

Số	Dòng vô tính ID #	CD33 ở người K_D (nM)	CD33 ở khỉ cynomolgus
----	-------------------	----------------------------	--------------------------

			K _D (nM)
1	280-03-08	0,3	0,03
2	280-21-09	0,4	0,3
3	280-29-12	0,5	0,6
4	280-31-01	0,4	0,3
5	280-31-01(đột biến)	1	0,5
6	280-34-02	0,3	0,5
7	280-50-01	0,3	0,5
8	280-50-01(đột biến)	0,4	1,7
9	280-61-07	0,3	0,4
10	283-03-03	0,3	1,9
11	283-05-01	0,2	1,1
12	283-07-03	0,3	2,1
13	283-11-03	0,3	0,6
14	283-14-01	3,2	2,3

Bảng 2

Ví dụ 2: Động học nội nhập

Sự nội nhập kháng thể dùng để chỉ sự giảm lượng phức hợp kháng thể/ kháng nguyên trên bề mặt tế bào của tế bào đích sau khi ủ với kháng thể. Các thử nghiệm nội nhập được tiến hành bằng dòng tế bào HL60 biểu hiện CD33. Các tế bào được ủ với một lượng cố định tác nhân gắn kết CD33 (10µg/ml kháng thể đơn dòng đầy đủ ở người được liệt kê trong bảng 1 số thứ tự từ 1 đến 14) với các khoảng thời gian xác định (0h, 1h, 4h, 24h) ở nhiệt độ 37°C cho phép sự nội nhập phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Tại các thời điểm được xác định axit được bổ sung vào hỗn hợp ủ để ngăn chặn sự nội nhập. Sau đó một lượng cố định tác nhân gắn kết CD33 được bổ sung vào để làm bão hòa tất cả các vị trí kháng nguyên CD33 trên bề mặt tế bào. Tổng lượng tác nhân gắn kết CD33 liên kết với bề mặt tế bào được xác định bằng phương pháp phân tích FACS sử dụng kháng thể thứ hai kháng IgG người được gắn FITC. Thời điểm 0h được sử dụng để xác định mức ban đầu của các phức hợp kháng thể /kháng nguyên CD33 trên bề mặt và được xác định là 100%. Các kết quả được liệt kê trong bảng 3 và được minh họa trong các Fig. từ 1 đến 3.

Số	Dòng vô tính ID #	Phức hợp kháng thể/kháng nguyên CD33 còn lại trên bề mặt tế bào sau thời gian 4h ủ với kháng thể (%)
1	280-03-08	49
2	280-21-09	41
3	280-29-12	49
4	280-31-01	44
5	280-31-01(đột biến)	52
6	280-34-02	44
7	280-50-01	53
8	280-50-01(đột biến)	55
9	280-61-07	47
10	283-03-03	45
11	283-05-01	51
12	283-07-03	48
13	283-11-03	46
14	283-14-01	47

Bảng 3

Lintuzumab được dùng làm kháng thể tham chiếu. Phức hợp Lintuzumab/CD33 được nội nhập nhanh chóng nhờ vào sự liên kết của lintuzumab phù hợp với dữ liệu được công bố. Sau khoảng thời gian ủ 4h chỉ khoảng 20% lượng ban đầu của phức hợp CD33/lintuzumab được giữ lại trên bề mặt tế bào. Nó có thể chứng minh được rằng, sự nội nhập, không kì vọng, tất cả 14 tác nhân gắn kết CD33 theo sáng chế được so sánh chậm hơn so với lintuzumab.

Ví dụ 3: Hoạt tính ADCC

Tốc độ nội nhập chậm thể hiện thành hoạt tính ADCC *in vitro* tăng. Để đánh giá tác dụng của sự nội nhập được kì vọng đối với hoạt tính ADCC của tác nhân gắn kết CD33 (kháng thể đơn dòng nguyên vẹn ở người được liệt kê trong bảng 1 với số thứ tự từ 1 đến 14), tế bào đích (HL60) được ủ với tác nhân gắn kết CD33 trong thời gian 0, 1, 4 và 24h. Sau đó thử nghiệm ADCC được tiến hành bằng PBMC được kích thích IL-2 như là tế bào đáp ứng lại kích thích và các tế bào HL60 được phủ bởi kháng thể như là tế bào đích. Đối với tất cả các thử nghiệm nồng độ mAb bằng 30µg/ml được sử dụng. Sự nuôi cấy đồng thời các tế bào đáp ứng lại kích thích với tế bào đích trong sự

có mặt của tác nhân gắn kết CD33 được tiến hành bốn lần hoặc ba lần trong các đĩa vi chuẩn độ đáy tròn 96-giếng với thể tích cuối cùng bằng 200 μ l môi trường thử nghiệm trên mỗi giếng chứa 10% huyết thanh người và 1% BSA trong RPMI với tỷ lệ 1:1. Đầu tiên tế bào đáp ứng lại kích thích (các tế bào PBMC mới được phân lập trong 100 μ l 10% huyết thanh người trong RPMI mỗi giếng) được dàn trên đĩa, sau đó là các tế bào đích và dung dịch tác nhân gắn kết CD33 (được pha loãng trong 50 μ l 1% BSA trong RPMI). Với đối chứng, tế bào đáp ứng lại kích thích được nuôi cấy chỉ trong môi trường thử nghiệm (đối chứng tế bào đáp ứng lại kích thích) và tế bào đích chỉ được nuôi cấy trong môi trường thử nghiệm (sự ly giải tức thời) hoặc trong môi trường thử nghiệm được bổ sung 1% Triton X-100 (sự ly giải tối đa). Đồng canh trường được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ CO₂ ẩm trong thời gian 3 giờ. Kết thúc các tế bào ủ được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm (200 x g, tức là 1000 vòng/phút; 10 phút) ở nhiệt độ trong phòng. Phần nổi trên mặt không chứa tế bào (100 μ l/giếng) được chuyển vào các giếng tương ứng của đĩa đáy phẳng 96-giếng. Để xác định hoạt tính của LDH trong phần dịch nổi này 100 μ l hỗn hợp phản ứng (250 μ l chất xúc tác mới được trộn với 11,25ml dung dịch thuốc nhuộm) được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong tối. Sau đó đo hệ số hấp thụ như được mô tả dưới đây.

Kit phát hiện tính gây độc tế bào (LDH; Roche 11 644 793 001) được sử dụng để đo hoạt tính ADCC. Sự phát hiện tính gây độc tế bào trên cơ sở phương pháp đo hoạt tính enzym LDH giải phóng từ tế bào bị tổn thương màng huyết tương. LDH được giải phóng vào phần dịch nổi trong canh trường làm khử muối tetrazoli của kit thử thành formazan. Sự hấp thụ tối đa của thuốc nhuộm formazan được đo ở 490nm đối với chiều dài bước sóng tham chiếu bằng 650nm trong máy đọc đĩa ELISA. Để xác định tỷ lệ phần trăm tính gây độc do tế bào gây ra, khả năng hấp thụ trung bình của bốn lần hoặc ba lần được tính toán và yếu tố khác được loại trừ. Các giá trị hiệu chỉnh này được thay thế bằng phương trình sau đây để tính ADCC (%):

(sự giải phóng tự phát có kiểm soát tế bào đáp ứng lại kích thích/tế bào đích trộn với tế bào đáp ứng lại kích thích) chia cho (sự giải phóng tự phát-giải phóng tối đa)

Hoạt tính của ADCC tại điểm thời gian 0h (không có kháng thể trước khi ủ của tế bào đích) được xác định là 100% hoạt tính ADCC. Hoạt tính ADCC đối với các thời điểm khác nhau của kháng thể trước khi ủ được tính toán tương quan với điểm thời gian 0h và được thể hiện bằng phần trăm gây độc tế bào tương đối (%).

Sự nội nhập chậm tác nhân gắn kết CD33 được so với lintuzumab kết quả là hoạt tính ADCC tăng cao so với lintuzumab. Tóm lại, sự nội nhập chậm dẫn đến hoạt tính ADCC tăng cao. Sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 được mô tả có tương quan ngược với hoạt tính của ADCC của tác nhân gắn kết CD33 biểu lộ ưu điểm đối với hoạt tính lâm sàng của tác nhân gắn kết CD33. Các kết quả được minh họa trong Fig. 4 về động học của sự nội nhập trong thử nghiệm này và trong Fig. 5 với hoạt tính của ADCC.

Ví dụ 4: Sự sắp xếp epitop

Epitop liên kết của tác nhân gắn kết CD33 được mô tả ở đây tương ứng với epitop của lintuzumab được xác định bằng Phổ khối trao đổi hydro (Hydrogen Exchange Mass Spectrometry - HXMS).

Phương pháp này xác định độ nhạy của hydro khung amit của protein CD33 để trao đổi với D₂O. Các thử nghiệm được tiến hành với chỉ protein CD33 tái tổ hợp và protein CD33 được gắn với chất liên kết CD33 / lintuzumab (dưới đây trong ví dụ dùng để chỉ “kháng thể / các kháng thể”). Các vùng protein CD33 thể hiện sự bảo vệ đáng kể khỏi sự trao đổi gây ra bởi liên kết của kháng thể được nhận biết. Độ phân giải trong phương pháp được xác định bằng các peptit được tạo ra bằng sự phân hủy pepsin, ví dụ trình tự axit amin tạo thành có thể lớn hơn epitop thực tế của kháng thể. Peptit có nguồn gốc từ CD33 này được nhận biết bằng các thử nghiệm đối chứng bổ sung với các mẫu không được trao đổi sử dụng khối lượng chuẩn chính xác và các kỹ thuật HPLC MS/MS.

Với mẫu protein + kháng thể, protein CD33 và kháng thể được ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tỷ lệ mol cuối cùng của kháng thể/CD33 là 2:1. Sử dụng hệ thống robot LEAP (đĩa trao đổi giữ ở nhiệt độ 25°C, mẫu/đĩa làm mát được giữ ở nhiệt độ 4°C), 8µl mẫu được bổ sung vào 80µl chất đệm trao đổi (10mM NaH₂PO₄ trong D₂O, pH=7 hoặc 10mM NaH₂PO₄ trong H₂O, pH=7), được trộn, và cho phép trao đổi với thời gian khác nhau (15, 60, 120, 240, và 600 giây) ở nhiệt độ 25°C. 80µl dung dịch này sau đó được chuyển vào 80µl chất đệm làm nguội (1M ure, 0,1M TCEP-HCl) ở nhiệt độ 4°C và được trộn. 90µl dung dịch này tiếp đó được chuyển vào 10µl pepsin (4mg/ml) ở nhiệt độ 4°C và được trộn. Sau thời gian 2 phút, 60µl dung dịch này được phun lên trên hộp sấy Michrom C18. Hộp được rửa bằng H₂O + 0,1%TFA trong thời gian 2 phút ở 100µl/phút. Van sau đó được đóng lại và hộp được rửa giải lên trên cột Phenomenex Jupiter C5, 1,0 x 50mm, 5µm, 300A. Pha

động A là nước/axetonitril/TFA (99/0,95/0,05) và pha động B là axetonitril/nước/TFA (95/4,95/0,05). Lưu lượng là 100µl/phút. Gradient là: 0 phút (0%B), 6 phút (40%B), 7 phút (40%B), 8 phút (90%B), 10 phút (90% B), 11 phút (0%B). Hệ thống LEAP làm mát sơ bộ pha động đến nhiệt độ 4°C và cột bơm và cột phân tích ở nhiệt độ 4°C. Với các thử nghiệm MS (được sử dụng để định lượng sự trao đổi bằng chất đệm D₂O), phương pháp quét đơn từ 300-2000 trong thời gian 14 phút được sử dụng có độ phân giải 60000. Với các thử nghiệm MS/MS (được sử dụng cho các peptit ID với đệm trao đổi H₂O), phương pháp quét 7 lần được sử dụng trong thời gian 14 phút. Lần quét đầu tiên là lần quét khoảng đầy đủ từ 300 đến 2000 với độ phân giải bằng 30000. Lần quét tiếp theo là quét CID của 6 ion mạnh nhất từ lần quét #1. Chiều rộng phân tách là 1,5amu, năng lượng va chạm là 35V, thời gian hoạt hóa là 30msec. Pepsin peptit được nhận biết bằng cách sử dụng dữ liệu phân mảnh và thiết bị phát hiện hệ protein theo chương trình (Thermo). Các peptit đã nhận biết được phân tích bằng cách sử dụng chương trình tiến hành trong một nhóm tính toán khối lượng trung bình của peptit được trao đổi.

Tất cả các tác nhân gắn kết CD33 bảo vệ đoạn peptit giống nhau với trình tự axit amin FFHPIPYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO: 141) (Bảng 4). Trình tự của CD33 được bảo vệ bởi tác nhân gắn kết CD33 được mô tả ở đây khác nhau và không chồng lặp với trình tự peptit của CD33 được bảo vệ bởi liên kết của Lintuzumab (MDPNFWLQVQE, SEQ ID NO: 142). Trong mô hình in silico sử dụng cấu trúc tinh thể của SIGLEC-5, thành viên trong gia đình SIGLEC tương đồng với CD33, epitop liên kết được phát hiện của tất cả các kháng thể trong vùng lân cận của protein, trong đó epitop liên kết của Lintuzumab khác với epitop của tác nhân gắn kết CD33 được mô tả ở đây. Cuối cùng, tác nhân gắn kết CD33 được mô tả trong đơn này liên kết với epitop khác với Lintuzumab.

Số	Dòng vô tính ID #	Epitop CD33
1	280-03-08	FFHPIPYDKNSPVHGYW
2	280-21-09	FFHPIPYDKNSPVHGYW
3	280-29-12	FFHPIPYDKNSPVHGYW
4	280-31-01	FFHPIPYDKNSPVHGYW
5	280-31-01 (đột biến)	FFHPIPYDKNSPVHGYW
6	280-34-02	FFHPIPYDKNSPVHGYW

7	280-50-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
8	280-50-01 (đột biến)	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
9	280-61-07	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
10	283-03-03	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
11	283-05-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
12	283-07-03	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
13	283-11-03	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
14	283-14-01	FFHPIPYYDKNSPVHGYW
15	Lintuzumab	MDPNFWLQVQE

Bảng 4

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tác nhân gắn kết CD33 gắn kết với CD33 của người, tác nhân gắn kết CD33 là:

kháng thể hoặc dẫn xuất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop trong trình tự axit amin FFHPIPYDYDKNSPVHGYW (SEQ ID NO: 141) của CD33 của người, trong đó tác nhân gắn kết CD33 được lựa chọn từ

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 1, CDR2 có SEQ ID NO: 15, CDR3 có SEQ ID NO: 29, CDR4 có SEQ ID NO: 43, CDR5 có SEQ ID NO: 57 và CDR6 có SEQ ID NO: 71;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 2, CDR2 có SEQ ID NO: 16, CDR3 có SEQ ID NO: 30, CDR4 có SEQ ID NO: 44, CDR5 có SEQ ID NO: 58 và CDR6 có SEQ ID NO: 72;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 3, CDR2 có SEQ ID NO: 17, CDR3 có SEQ ID NO: 31, CDR4 có SEQ ID NO: 45, CDR5 có SEQ ID NO: 59 và CDR6 có SEQ ID NO: 73;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 4, CDR2 có SEQ ID NO: 18, CDR3 có SEQ ID NO: 32, CDR4 có SEQ ID NO: 46, CDR5 có SEQ ID NO: 60 và CDR6 có SEQ ID NO: 74;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 5, CDR2 có SEQ ID NO: 19, CDR3 có SEQ ID NO: 33, CDR4 có SEQ ID NO: 47, CDR5 có SEQ ID NO: 61 và CDR6 có SEQ ID NO: 75;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 6, CDR2 có SEQ ID NO: 20, CDR3 có SEQ ID NO: 34, CDR4 có SEQ ID NO: 48, CDR5 có SEQ ID NO: 62 và CDR6 có SEQ ID NO: 76;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 7, CDR2 có SEQ ID NO: 21, CDR3 có SEQ ID NO: 35, CDR4 có SEQ ID NO: 49, CDR5 có SEQ ID NO: 63 và CDR6 có SEQ ID NO: 77;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 8, CDR2 có SEQ ID NO: 22, CDR3 có SEQ ID NO: 36, CDR4 có SEQ ID NO: 50, CDR5 có SEQ ID NO: 64 và CDR6 có SEQ ID NO: 78;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 9, CDR2 có SEQ ID NO: 23, CDR3 có SEQ ID NO: 37, CDR4 có SEQ ID NO: 51, CDR5 có SEQ ID NO: 65 và CDR6 có SEQ ID

NO: 79;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 10, CDR2 có SEQ ID NO: 24, CDR3 có SEQ ID NO: 38, CDR4 có SEQ ID NO: 52, CDR5 có SEQ ID NO: 66 và CDR6 có SEQ ID NO: 80;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 11, CDR2 có SEQ ID NO: 25, CDR3 có SEQ ID NO: 39, CDR4 có SEQ ID NO: 53, CDR5 có SEQ ID NO: 67 và CDR6 có SEQ ID NO: 81;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 12, CDR2 có SEQ ID NO: 26, CDR3 có SEQ ID NO: 40, CDR4 có SEQ ID NO: 54, CDR5 có SEQ ID NO: 68 và CDR6 có SEQ ID NO: 82;

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 13, CDR2 có SEQ ID NO: 27, CDR3 có SEQ ID NO: 41, CDR4 có SEQ ID NO: 55, CDR5 có SEQ ID NO: 69 và CDR6 có SEQ ID NO: 83; và

kháng thể chứa CDR1 có SEQ ID NO: 14, CDR2 có SEQ ID NO: 28, CDR3 có SEQ ID NO: 42, CDR4 có SEQ ID NO: 56, CDR5 có SEQ ID NO: 70 và CDR6 có SEQ ID NO: 84.

2. Tác nhân gắn kết CD33 gắn kết với CD33 của người, tác nhân gắn kết CD33 là:

kháng thể hoặc dẫn xuất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop trong trình tự axit amin FFHPIP YYDKN SPVHGYW (SEQ ID NO: 141) của CD33 của người, trong đó tác nhân gắn kết CD33 được lựa chọn từ

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 99;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 86 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 100;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 87 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 101;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 88 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 102;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 89 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 103;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 90 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 104;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 105;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 92 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 106;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 93 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 107;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 94 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 108;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 95 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 109;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 96 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 110;

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 97 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 111; và

kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 98 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 112.

3. Tác nhân gắn kết CD33 gắn kết với CD33 của người, tác nhân gắn kết CD33 là:

kháng thể hoặc dẫn xuất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop trong trình tự axit amin FFHPIP YYDKN SPVHGYW (SEQ ID NO: 141) của CD33 của người, trong đó tác nhân gắn kết CD33 được lựa chọn từ:

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 113 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 127;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 114 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 128;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 115 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 129;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 116 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 130;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 117 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 131;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 118 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 132;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 119 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 133;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 120 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 134;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 121 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 135;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 122 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 136;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 123 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 137;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 124 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 138;

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 125 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 139; và

kháng thể chứa chuỗi nặng có SEQ ID NO: 126 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 140.

4. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 1, trong đó động học của sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 là sao cho ở mức ít nhất 30% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 duy trì trên bề mặt các tế bào HL60 ở thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

5. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 2, trong đó động học của sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 là sao cho ở mức ít nhất 30% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 duy trì trên bề mặt các tế bào HL60 ở thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

6. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 3, trong đó động học của sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 là sao cho ở mức ít nhất 30% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 duy trì trên bề mặt các tế bào HL60 ở thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

7. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 1, trong đó động học của sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33 là sao cho ở mức ít nhất 40% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 duy trì trên bề mặt các tế bào HL60 ở thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

8. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 2, trong đó động học của sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33s là sao cho ở mức ít nhất 40% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 duy trì trên bề mặt các tế bào HL60 ở thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

9. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 3, trong đó động học của sự nội nhập của tác nhân gắn kết CD33s là sao cho ở mức ít nhất 40% lượng ban đầu của tác nhân gắn kết CD33 duy trì trên bề mặt các tế bào HL60 ở thời điểm 4 giờ sau khi ủ.

10. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 1, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.

11. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 2, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
12. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 3, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
13. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 4, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
14. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 5, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
15. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 6, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
16. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 7, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
17. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 8, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
18. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 9, trong đó tác nhân gắn kết CD33 có ái lực đối với cả CD33 của người và CD33 của khỉ *Cynomolgus* với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10nM.
19. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-18, trong đó tác nhân gắn kết CD33 được làm giống như của người.
20. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-18, trong đó tác nhân gắn kết CD33 là nguyên vẹn từ người.
21. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-18, trong đó tác nhân gắn kết CD33 còn có chức năng đáp ứng lại kích thích.
22. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 19, trong đó tác nhân gắn kết CD33 còn có chức năng đáp ứng lại kích thích.

23. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 20, trong đó tác nhân gắn kết CD33 còn có chức năng đáp ứng lại kích thích.
24. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 21, trong đó chức năng đáp ứng lại kích thích được trung gian bởi vùng Fc.
25. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 22, trong đó chức năng đáp ứng lại kích thích được trung gian bởi vùng Fc.
26. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 23, trong đó chức năng đáp ứng lại kích thích được trung gian bởi vùng Fc.
27. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 21, trong đó tác nhân gắn kết CD33 chứa một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc mà điều biến chức năng của vùng Fc.
28. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 22, trong đó tác nhân gắn kết CD33 chứa một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc mà điều biến chức năng của vùng Fc.
29. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 23, trong đó tác nhân gắn kết CD33 chứa một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc mà điều biến chức năng của vùng Fc.
30. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 27, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 10%.
31. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 28, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 10%.
32. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 29, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 10%.
33. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 30, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 50%.
34. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 31, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 50%.
35. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 32, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 50%.
36. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 33, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 100%.
37. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 34, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự

tăng ADCC ít nhất là 100%.

38. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 35, trong đó chức năng điều biến vùng Fc là sự tăng ADCC ít nhất là 100%.

39. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 3, trong đó tác nhân gắn kết CD33 chứa một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc mà chức năng điều biến của vùng Fc, sự đột biến của vùng Fc là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ các axit amin ở các vị trí 332 và/hoặc 239 và/hoặc 236 theo chỉ số đánh số Kabat của EU.

40. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 39, trong đó đột biến trong vùng Fc là tổ hợp của sự thay thế ở các vị trí 239 và 332.

41. Tác nhân gắn kết CD33 theo điểm 40, trong đó đột biến trong vùng Fc là S239D/I332E.

42. Phân tử ADN chứa vùng mã hóa tác nhân gắn kết CD33 theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

43. Vector biểu hiện chứa phân tử ADN theo điểm 42.

44. Tế bào chủ mang một hoặc nhiều vector theo điểm 43.

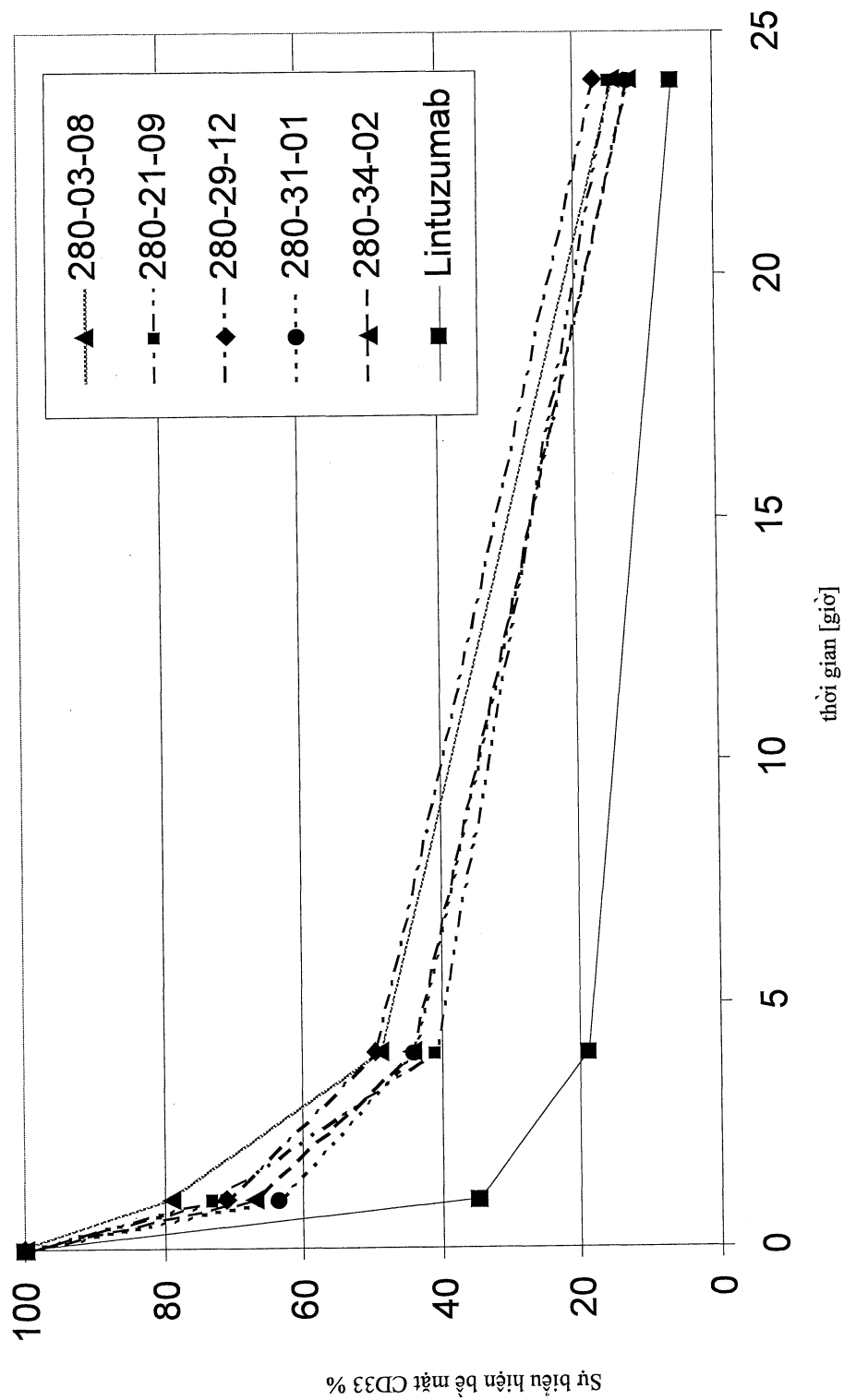
45. Phương pháp sản xuất tác nhân gắn kết CD33 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 41, chứa bước chuyển nhiễm tế bào chủ với một hoặc nhiều vector theo điểm 43, nuôi cấy tế bào chủ, thu hồi và tinh sạch phân tử kháng thể.

46. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều tác nhân gắn kết CD33 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 41 làm thành phần hoạt tính, và ít nhất một chất mang dược dụng.

47. Dược phẩm theo điểm 46, trong đó dược phẩm chứa thêm một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung.

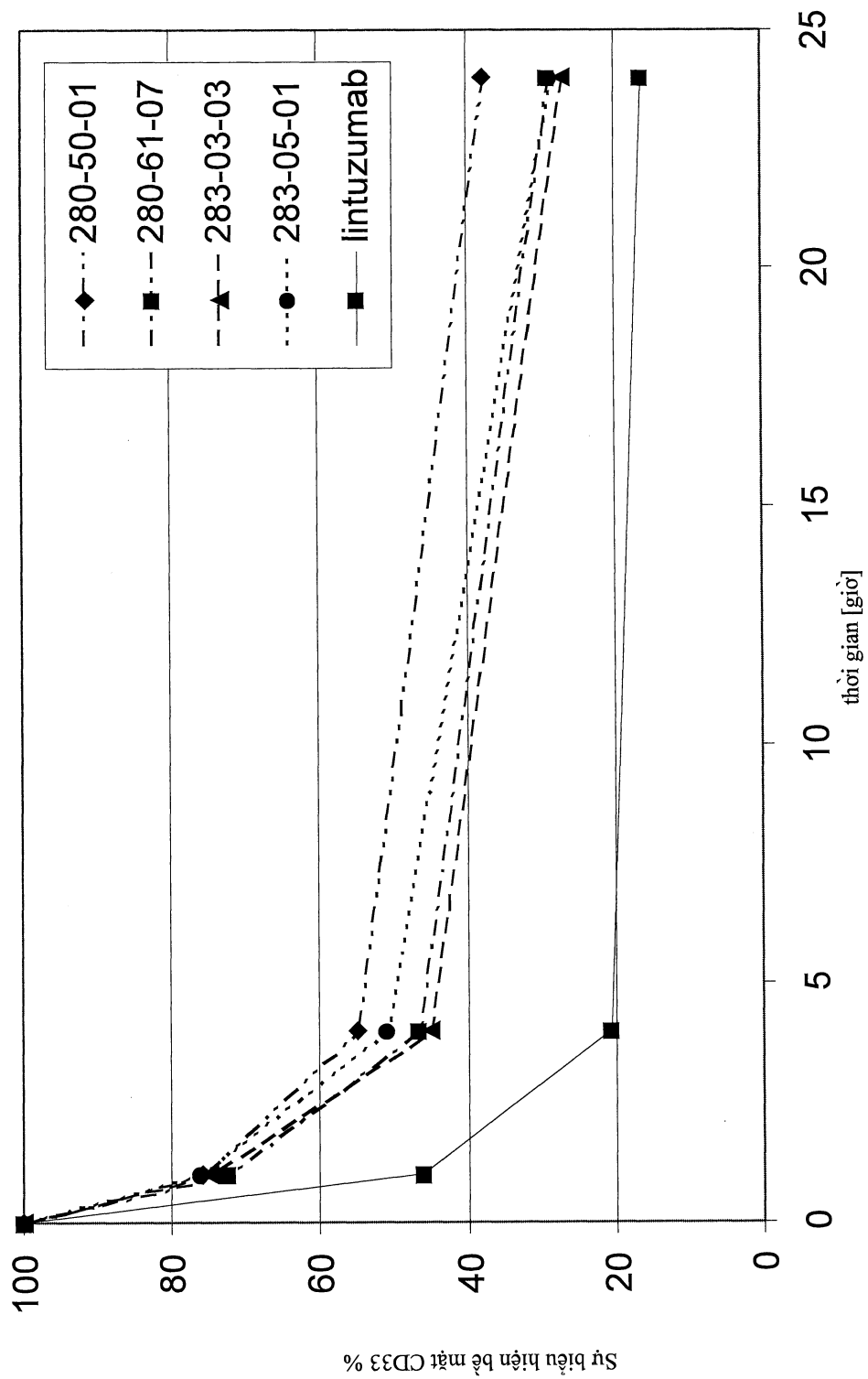
1/5

Fig. 1



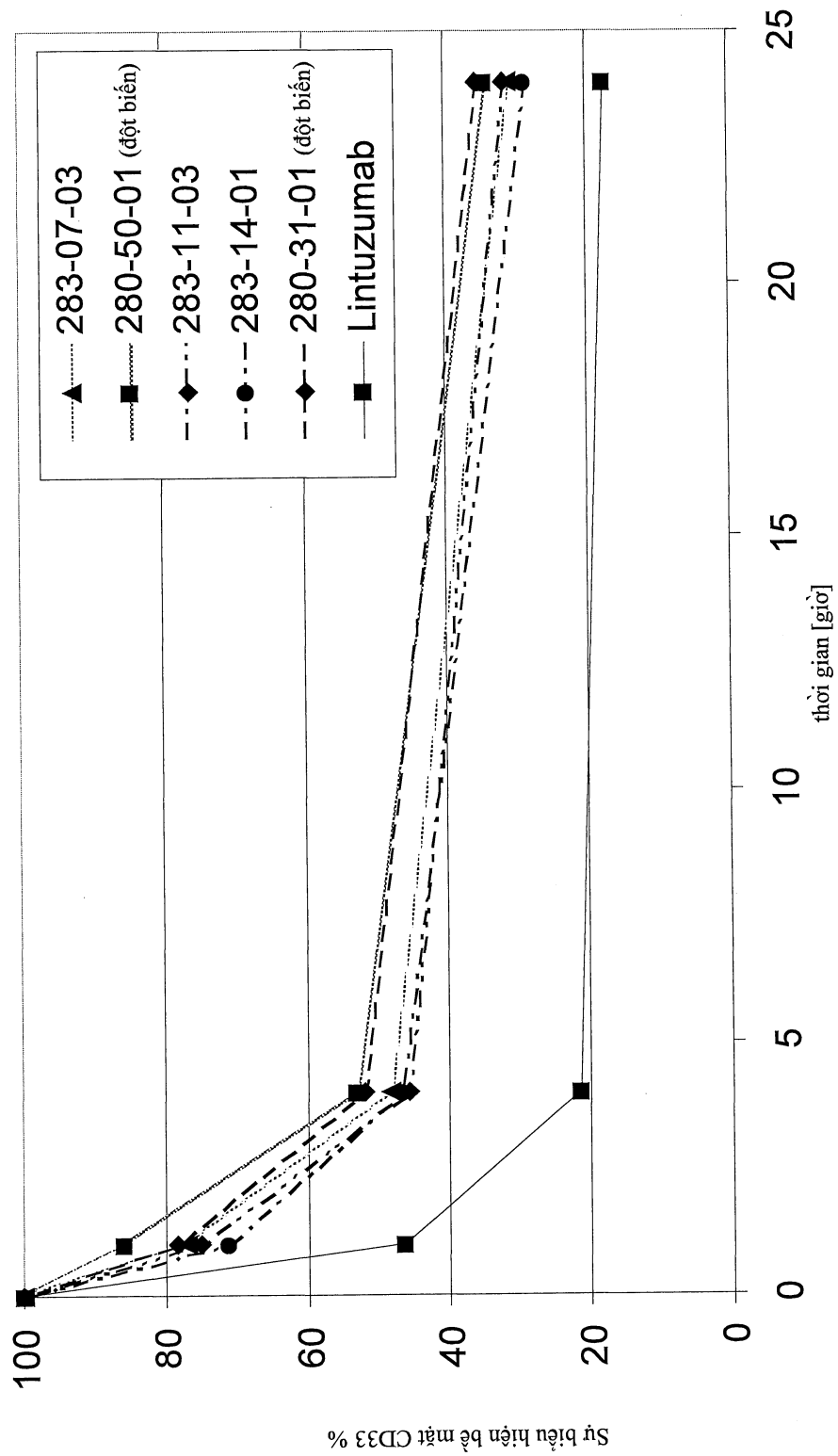
2/5

Fig. 2



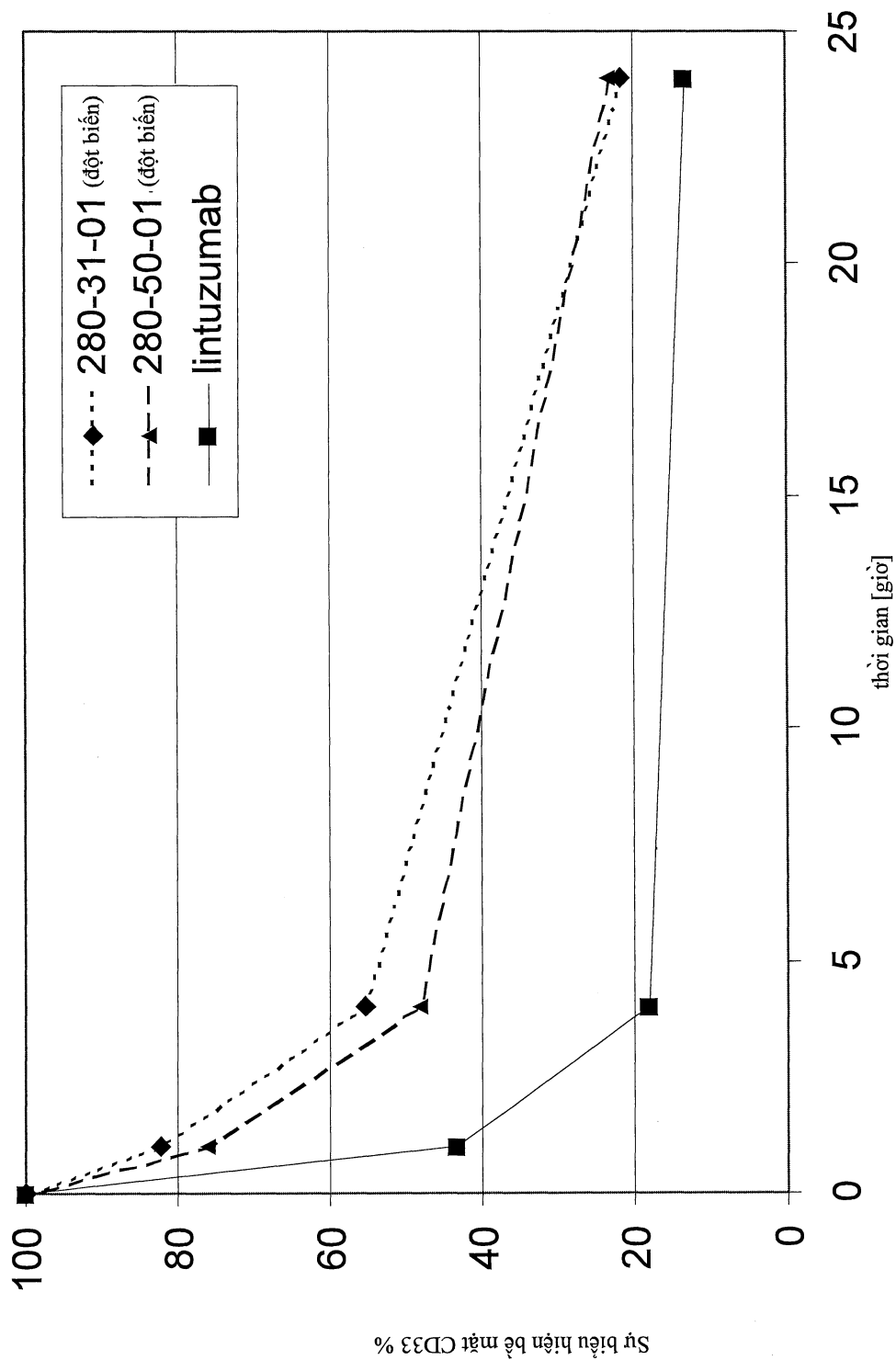
3/5

Fig. 3



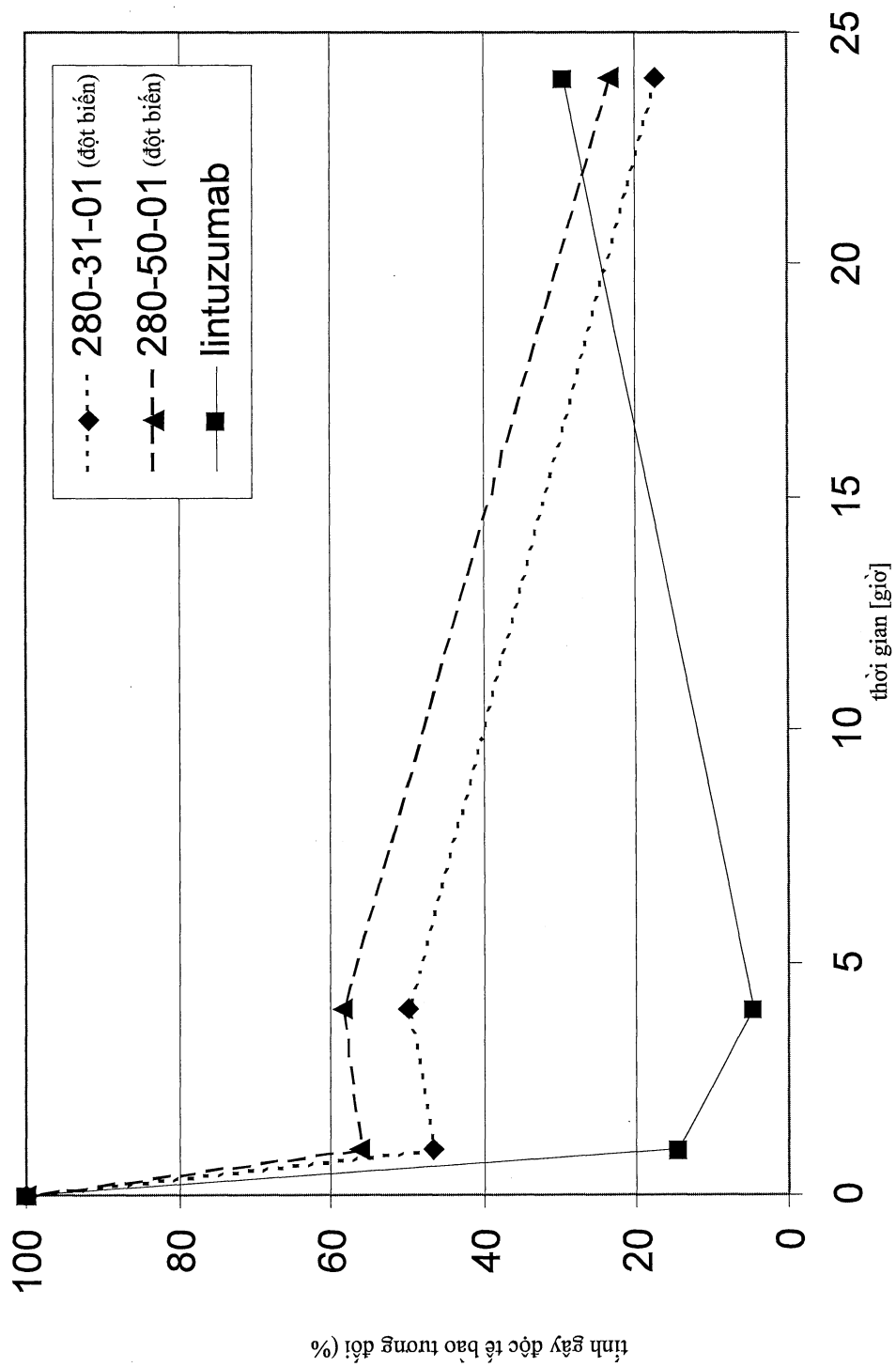
4/5

Fig. 4



5/5

Fig. 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

<120> Tác nhân gắn kết CD33 và dược phẩm chứa tác nhân gắn kết này

<130> 12-0321-PCT

<160> 142

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 1

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 2

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 3

His Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 4

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 5

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 6

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 7

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 8

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 9

Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 10

Glu Gly Gly Val Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 11

Glu	Gly	Gly	Val	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5					10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 12

Glu	Gly	Gly	Val	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5					10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 13

Glu	Gly	Gly	Val	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5					10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 14

Glu	Gly	Gly	Val	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5					10

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 15

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 16

Arg Ile Ile Pro Ile Ile Asn Ile Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

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

<220>
 <223> CDR

<400> 17

Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 18

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 19

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 20

Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Asn Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 21

Arg	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Gly	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	Gln	Asn	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 22

Arg	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Gly	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	Gln	Asn	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 23

Arg	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Gly	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	Gln	Asn	Phe	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 24

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 25

Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 26

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 27

Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 28

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 29

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 30

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 31

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 32

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 33

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 34

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 35

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 36

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 37

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 38

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 39

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 40

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 41

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 42

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 43

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 44

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr

1

5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 45

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr

1

5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 46

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr

1

5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 47

Gln Gln Phe Asp Ser Ser Ile Thr

1

5

<210> 48

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 48

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 49

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
 1 5

<210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 50

Gln Gln Phe Asp Ser Ser Ile Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 51

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr

1 5

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 52

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 53

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 54

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 55

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 56

Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 57

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 58

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 59

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 60

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 61

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 62

Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 63

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 64

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 65

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 66

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 67

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 68

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 69

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 70

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala

1

5

10

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1

5

10

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1

5

10

<210> 74

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 74

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
 1 5 10

<210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
 1 5 10

<210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 77

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala

1 5 10

<210> 78
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
 1 5 10

<210> 79
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 79

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
 1 5 10

<210> 80
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 80

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 81

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 84

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 85

<211> 117

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 85

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 86

<211> 117

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 86

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 87

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 88
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> VH
 <400> 88
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 89
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 89

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 90

<211> 117
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 90

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Asn Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 91
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 91

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

[illegible]

<210>	92
<211>	117
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ VH

<400> 92

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 93
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 93

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

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

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

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

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

Met Ala Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 94
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 94

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 95
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 95

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 96
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 96

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 97

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

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 98
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 98

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 99
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 99

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 100

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 100

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 101
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 101

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20

25

30

Leu Ala Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 102

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 102

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 103
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 103

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Ser Ser Ile Thr
 85 90 95

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

<210> 104
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 104

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 105

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 106

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 106

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Ser Ser Ile Thr
 85 90 95

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

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

<220>
<223> VL

<400> 107

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 108
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 108

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 109
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 109

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

 <210> 110
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> VL

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

<210> 111
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 111

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 112
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 112

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 113
<211> 447
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 113

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Arg Thr Ala Tyr

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

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

<210> 114
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 114

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 115
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 115

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Trp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

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

340

345

350

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

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

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

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

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

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

<210> 116
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 116

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 117
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 117

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 210 215 220		
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val 225 230 235 240		
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr 245 250 255		
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu 260 265 270		
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys 275 280 285		
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser 290 295 300		
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys 305 310 315 320		
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile 325 330 335		
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro 340 345 350		
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 355 360 365		
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn 370 375 380		
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser 385 390 395 400		
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		

405

410

415

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

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

<210> 118
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 118

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Asn Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 119
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 119

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Ile Ile Gly Ile Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Phe

50		55		60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr				
65		70		75
Met Ala Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85		90	95
Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met				
	100		105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu				
	115		120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys				
	130		135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser				
145		150		155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser				
	165		170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser				
	180		185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn				
	195		200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His				
	210		215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val				
225		230		235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr				
	245		250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu				

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

<210> 120

<211> 447

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 120

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 121

<211> 447

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 121

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Trp Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

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

325

330

335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 122
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 122

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 123
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 123

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

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

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

				165					170					175			
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185					190				
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
	210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
225					230					235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
			245						250					255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
	275						280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310					315					320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325					330					335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
			340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
		355					360					365					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		

370

375

380

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

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

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

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

Lys

<210> 124

<211> 449

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 124

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 125
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 125

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

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Ile Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	245	250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	260	265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	275	280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
	290	295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	340	345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	370	375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		

405

410

415

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

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

Lys

<210> 126
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 126

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210>	127
<211>	213
<212>	PRT
<213>	Nhân tao

<220>
<223> VL

<400> 127

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val

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

<210> 128

<211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 128

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

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

<220>
 <223> VL

<400> 129

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

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

Leu Ala Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115

120

125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

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

<220>
 <223> VL

<400> 130

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

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

<220>
<223> VL

<400> 131

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

210

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

<220>
 <223> VL

<400> 132

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

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

<220>
 <223> VL

<400> 133

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100

105

110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

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

<220>
 <223> VL

<400> 134

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

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

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

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

<210> 135
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 135

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 136

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 136

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 137
<211> 213
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 137

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Ser Ile Thr

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 138
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 138

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 139

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 139

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180

185

190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 140
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 140

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Met Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 141
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Loại epitop

<400> 141

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

Tyr Trp

<210> 142
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Loại epitop

<400> 142

Met	Asp	Pro	Asn	Phe	Trp	Leu	Gln	Val	Gln	Glu
1				5					10	